F 1330

studii şi cercetări de

biochimie

1

TOMUL 17

1974

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochim., tomul 17, nr. 1, p. 1–118, Bucureşti, martie 1974

SCBIAS – 17 (1), 1–118 (1974)

COMITETUL DE REDACŢIE

Redactor responsabil:

Academician E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUŞANSCHI

Membri:

S. OERIU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; TR. RĂDULESCU; VICTORIA ALEXANDRESCU

Secretar de redacţie:

VICTOR GHEŢIE

Revista apare de 4 ori pe an.

Preţul unui abonament anual este de 80 lei.

În ţară abonamentele se fac la oficiile poştale, agenţiile poştale, factorii poştali şi difuzorii voluntari din întreprinderi şi instituţii. Revista se poate procura (direct sau prin poştă) şi prin PUNCTUL DE DESFACERE din cadrul Editurii Academiei.

Orice comandă din străinătate (numere izolate sau abonamente) se face prin Întreprinderea Rompresfilatelia, Căsuţa poştală 2001 — telex 011631, Bucureşti, România, sau prin reprezentanţii săi din străinătate.

Manualele, cărţile şi revistele pentru schimb, precum şi orice corespondenţă, se vor trimite pe adresa Comitetului de redacţie al revistei „Studii şi cercetări de biochimie": Bucureşti, str. Docenţilor, nr. 20, sectorul 1.

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA
Bucureşti, str. GUTENBERG nr. 3 bis, sectorul 6

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

BIOCHIMIE

Tomul 17, nr. 1 1974

SUMAR

E. MACOVSCHI, A. GHERGHI, C. RABEGA, M. RABEGA, A. MIHĂESCU, Activitatea L-asparaginazei şi L-alanin α-cetoglutarat aminotransferazei în sucurile stoarse din mere păstrate la temperaturi coborîte 5

I. BRAD, M. TERBEA, Z. MARCU, N. HURDUC, Influenţa infectării cu *Fusarium moniliforme* Scheld a unor linii şi hibrizi de porumb, asupra spectrului izoenzimelor peroxidazice 11

L. JERCA, V. ARTENIE, L. ABABEI, Influenţa unor derivaţi sulfonamidaţi ai acizilor clor-fenoxiacetici şi clor-fenoxipropionici asupra activităţii penicilinazei 15

V. JURCĂ, Influenţa molibdenului asupra fosforilării oxidative şi activităţii succinat-dehidrogenazei în mitocondrii din organe de diferite vertebrate 25

V. JURCĂ, G. DRUGOCIU, L. RUNCEANU, V. HRIŢCU, Proteinele serice şi din lapte la vacile Holstein în raport cu tipul de sistem nervos al acestora 31

O. MAMULEA, I. CICOTTI, Consideraţii privind dozarea ureei sanguine prin testul rapid „Urastrat" 37

G. NEAMŢU, C. BODEA, Cercetări chemotaxonomice la plantele superioare. VII. Pigmenţii carotenoidici din unele specii ale genului *Aesculus* 41

R. OLINESCU, Perturbarea metabolismului glucidic în boala de iradiere 47

T. RUSĂNESCU, R. MURGOCI, Imunogenicitatea unor glicoproteine tumorale totale şi desializate 59

H. D. SCHELL, M. CÂRSTEANU, Cromatografia pe coloană de carboximetil-agaroză a proteinelor sarcoplasmatice şi evoluţia acestora în filogenie 71

M. TĂMAŞ, Variaţia conţinutului de flavone în frunzele de *Vaccinium vitis-idaea* L. şi *V. myrtillus* L., în funcţie de gradul de iluminare 77

REFERAT GENERAL

V. GHEŢIE, Catabolizarea imunoglobulinelor 83

RECENZII 97

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

BIOCHIMIE

Tome 17, no. 1 1974

CONTENTS

E. MACOVSCHI, A. GHERGHI, C. RABEGA, M. RABEGA, A. MIHĂESCU, The activities of L-asparaginase and L-alanine α-cetoglutarate aminotransferase in saps expressed from apples maintained at low temperatures 5

I. BRAD, M. TERBEA, Z. MARCU, N. HURDUC, The influence of *Fusarium moniliforme* Scheld infection on the peroxidase isoenzymes of different corn hybrids and inbreds 11

L. JERCA, V. ARTENIE, L. ABABEI, The influence of some sulfonamide derivatives of chloro-phenoxyacetic acid and chloro-phenoxypropionic acid on penicillinase activity 15

V. JURCĂ, The influence of molybdenum on the oxidative phosphorylation and on succinate dehydrogenase activity in mitochondria from organs in different vertebrates 25

V. JURCĂ, G. DRUGOCIU, L. RUNCEANU, V. HRIŢCU, Serum and milk proteins in cows of Holstein race related to the nervous system type 31

O. MAMULEA, I. CICOTTI, Considerations on blood urea assays by the "Urastrat" rapid test 37

G. NEAMŢU, C. BODEA, Chemotaxonomic investigations on higher plants. VII. Carotenoid pigments in some species of *Aesculus* genus 41

R. OLINESCU, The modification of the carbohydrate metabolism in radiation disease . . 47

T. RUSĂNESCU, R. MURGOCI, Immunogenicity of total and desializated tumoral α_1-glycoproteins 59

H. D. SCHELL, M. CÂRSTEANU, Column chromatography on carboxymethyl-agarose of sarcoplasmatic proteins and their evolution in phylogeny 71

M. TĂMAŞ, Variation of the flavonoids content in the leaves of *Vaccinium vitis-idaea* L. and *V. myrtillus* L. in accordance with their degree of illumination 77

REVIEW

V. GHEŢIE, Immunoglobulins catabolism 83

BOOK REVIEW 97

ST. CERC. BIOCHIM., 17, 1, 5—9 (1974)

ACTIVITATEA L-ASPARAGINAZEI ŞI L-ALANIN α-CETOGLUTARAT AMINOTRANSFERAZA ÎN SUCURILE STOARSE DIN MERE PĂSTRATE LA TEMPERATURI COBORÎTE

E. MACOVSCHI, A. GHERGHI, C. RABEGA, MARIA RABEGA şi ANGELA MIHĂESCU

Rezumat. — S-a urmărit activitatea L-asparaginazei şi L-alanin α-cetoglutarat aminotransferazei în sucurile vacuolar şi plasmatic ale merelor Ionathan şi Parmen auriu păstrate la temperaturi de aproximativ 9° C şi 3 °C. S-a constatat că în decursul păstrării merelor activitatea L asparaginazei creşte, iar acea a L alanin α-cetoglutarat aminotransferazei scade. S-au tras unele concluzii privind prezenţa acestor enzime în materia biostructurată şi în soluţia intracelulară a merelor.

În lucrările precedente s-a arătat că sucul vacuolar şi sucul plasmatic stoarse din ţesuturi vegetale prezintă o activitate enzimatică variată. Aşa, de exemplu : în sucurile obţinute din frunze de varză s-a cercetat activitatea fosfatazei acide [1], în sucurile din frunze de porumb s-a urmărit activitatea ribonucleazei [2], în cele din frunze de varză şi de porumb s-a cercetat activitatea peroxidazei [3], iar în cele de porumb şi grîu a fost investigată atît activitatea L asparaginazei [4] şi L alanin α cetoglutarat aminotransferazei [5] cît şi activitatea peroxidazei [6].

Conform concepţiei biostructurale despre natura şi structura materiei vii, activitatea enzimatică a sucului vacuolar corespunde aproximativ celei din soluţia intracelulară, iar activitatea enzimatică a sucului plasmatic depinde aproximativ de enzimele eliberate din materia biostructurată [7]. Înseamnă că urmărind activitatea enzimelor în ambele sucuri, stoarse din cînd în cînd dintr-un material vegetal pus la păstrat, s-ar putea obţine unele informaţii privind atît comportarea în timp a materiei biostructurate din materialul respectiv, cît şi raporturile dintre această materie şi soluţia intracelulară.

În acest cadru, un anumit interes ar prezenta cercetarea activităţii enzimatice a sucurilor vacuolar şi plasmatic, stoarse periodic din mere de toamnă puse la păstrat la temperaturi coborîte. De aceea am urmărit activitatea L asparaginazei şi L alanin α-cetoglutarat aminotransferazei la două soiuri de mere de toamnă, păstrate la două temperaturi diferite.

MATERIAL ŞI METODE

Cercetările le-am efectuat pe sucurile vacuolar şi plasmatic stoarse din mere Ionathan şi Parmen auriu, păstrate în cursul iernii, în silozuri, la temperaturi de $+9° \pm 1°C.$, şi $+3° \pm 1°C.$. *).

Sucurile le obţineam prin tehnica folosită în lucrările anterioare (6) şi de aceea nu vom insista asupra ei. Menţionăm numai că pentru stoarcerea sucurilor foloseam presa hidraulică de laborator Hafico, model 2 litri; am lucrat pe probe medii de mere, fiecare probă fiind de 500 g; sucul vacuolar se storcea din material proaspăt, la presiunea de 200 atm. indicată de manometrul presei în cazul merelor Ionathan, şi la 150 atm. în cazul merelor Parmen auriu. După stoarcerea sucului vacuolar, reziduul din presă se menţinea timp de 48 ore la temperatura de $-10° \pm 1°C.$ pentru destrămarea biostructurii; după dezgheţare, reziduul se storcea în aceleaşi condiţii, obţinîndu-se sucul plasmatic.

În sucurile obţinute se determina, după centrifugare, activitatea L asparaginazei după metoda *Meister* [8], amoniacul după procedeul preconizat de *Conway* [9], proteina după tehnica propusă de *Miller* [10], iar activitatea L alanin α-cetoglutarat aminotransferazei după metoda *Rosen*, *Roberts* şi *Nichol* [11]. Activitatea L asparaginazei a fost exprimată în miligrame amoniac pe mililitru suc, iar activitatea L alanin α-cetoglutarat aminostransferazei în micromoli de acid piruvic pe mililitru şi minut la 38°C.

Analizele s-au făcut o dată în decembrie 1972, de cîte două ori în ianuarie şi februarie şi de patru ori în martie 1973.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Rezultatele obţinute sînt prezentate sub forma de grafice care reprezintă variaţia activităţii enzimelor în funcţie de durata păstrării merelor.

După cum rezultă din fig. 1, activitatea L-asparaginazei este cam la fel de intensă atît în sucul plasmatic cît şi în cel vacuolar al merelor Ionathan păstrate la $+9° \pm 1°C$, creşte pe măsură ce timpul trece şi devine maximă la sfîrşitul perioadei de păstrare a merelor în siloz. Aceeaşi constatare se desprinde şi din curbele care reprezintă cazul sucurilor de mere Ionathan păstrate la $+3° \pm 1°C$. Rezultate similare au fost obţinute şi la merele Parmen auriu păstrate la cele două temperaturi (fig. 2).

Cu totul altfel se prezintă situaţia în cazul L alanin α-cetoglutarat aminotransferazei. În sucul plasmatic activitatea acestei enzime este considerabil mai intensă decît în sucul vacuolar, în ambele sucuri ea scade pe măsură ce timpul trece şi devine practic nulă la sfîrşitul perioadei de păstrare a merelor în siloz. Aceste rezultate, consemnate în figurile 3 şi 4,

*) Mulţumim dr. I. Burzo de la Institutul de Cercetări şi proiectări pentru construcţii horti-viticole din Bucureşti, precum şi chimistei Liana Mărgineanu şi ing. R. Batovici de la Silorile din Bistriţa-Năsăud, pentru punerea la dispoziţie a merelor necesare cercetării şi pentru colaborare.

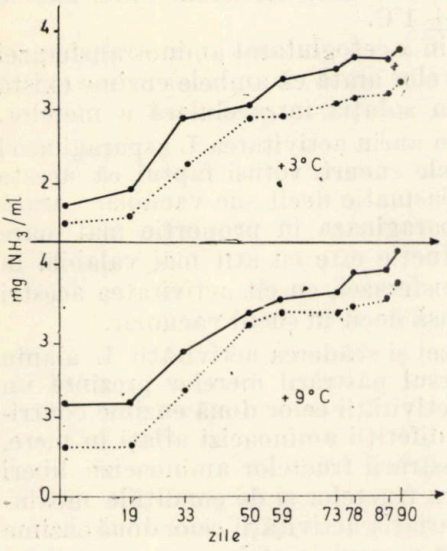


Fig. 1. — Creşterea activităţii L-asparaginazei în sucurile plasmatic (—) şi vacuolar (— — —) ale merelor Ionathan, păstrate 90 de zile la temperatura de +9° C şi +3°C.

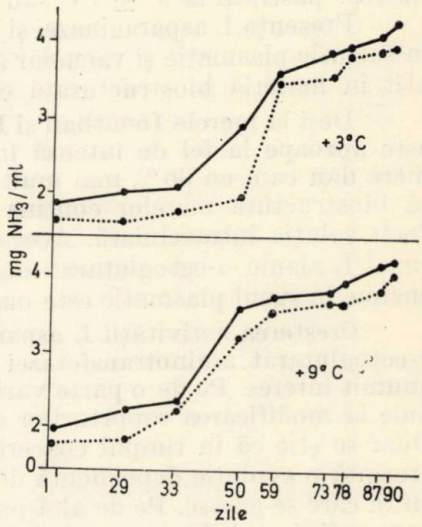


Fig. 2. — Creşterea activităţii L-asparaginazei în sucurile plasmatic (—) şi vacuolar (— — —) ale merelor Parmen auriu, păstrate 90 de zile la temperatura de +9°C şi +3°C.

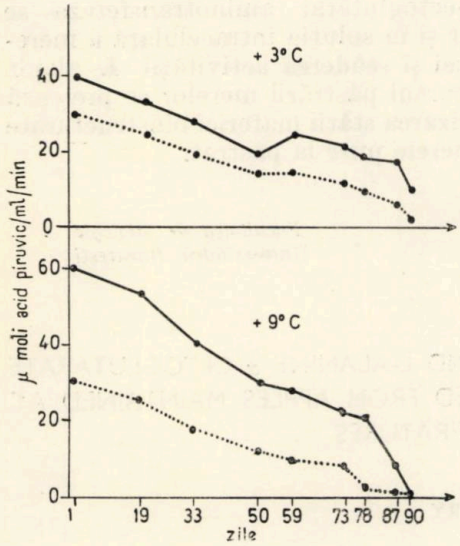


Fig. 3. — Scăderea activităţii L-alanin α-cetoglutarat aminotransferazei în sucurile plasmatic (—) şi vacuolar (— — —) ale merelor Ionathan, păstrate 90 de zile la temperatura de +9°C şi +3°C.

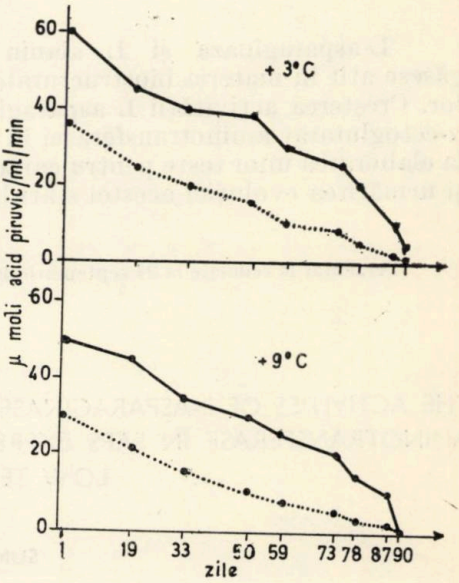


Fig. 4. — Scăderea activităţii L-alanin α-cetoglutarat aminotransferazei în sucurile plasmatic (—) şi vacuolar (— — —) ale merelor Parmen auriu, păstrate 90 de zile la temperatura de +9°C şi +3°C.

s-au obţinut la sucurile ambelor soiuri de mere, indiferent dacă merele au fost păstrate la 9° ± 1°C sau la 3° ± 1°C.

Prezenţa L asparaginazei şi L alanin α-cetoglutarat aminotransferazei în sucurile plasmatic şi vacuolar ale merelor arată că ambele enzime există atît în materia biostructurată cît şi în soluţia intracelulară a merelor.

Deşi la merele Ionathan şi Parmen auriu activitatea L asparaginazei este aproape la fel de intensă în ambele sucuri, totuşi faptul că aceste mere dau cam cu 30% mai mult suc plasmatic decît suc vacuolar arată că biostructura merelor conţine L asparaginaza în proporţie mai mare decît soluţia intracelulară. Această deducţie este cu atît mai valabilă în cazul L alanin α-cetoglutarat aminotransferazei, cu cît activitatea acestei enzime în sucul plasmatic este mai intensă decît în sucul vacuolar.

Creşterea activităţii L asparaginazei şi scăderea activităţii L alanin α-cetoglutarat aminotransferazei în cursul păstrării merelor prezintă un anumit interes. Pe de o parte variaţia activităţii celor două enzime contribuie la modificarea raporturilor dintre diferiţii aminoacizi aflaţi în mere. Doar se ştie că în timpul coacerii şi păstrării fructelor aminoacizii liberi prezintă o evoluţie dependentă de natura fructelor şi de condiţiile mediului în care se găsesc. Pe de altă parte, variaţia activităţii celor două enzime pare a fi destul de caracteristică pentru a servi la elaborarea unor teste privind starea biostructurii merelor în diferite etape ale perioadei de păstrare.

CONCLUZII

L-asparaginaza şi L alanin α-cetoglutarat aminotransferaza se găsesc atît în materia biostructurată cît şi în soluţia intracelulară a merelor. Creşterea activităţii L asparaginazei şi scăderea activităţii L alanin α-cetoglutarat aminotransferazei în decursul păstrării merelor se pretează la elaborarea unor teste pentru caracterizarea stării materiei biostructurate şi urmărirea evoluţiei acestei stări la merele puse la păstrat.

Prezentat la redacţie la 24 septembrie 1973

Facultatea de Biologie
Universitatea Bucureşti

THE ACTIVITIES OF L-ASPARAGINASE AND L-ALANINE α CETOGLUTARATE AMINOTRANSFERASE IN SAPS EXPRESSED FROM APPLES MAINTAINED AT LOW TEMPERATURES

SUMMARY

The activities of L-asparaginase and L-alanine α-cetoglutarate aminotransferase in vacuolar and plasmatic saps of Ionathan and golden Parmen apples maintained at low temperatures (about 9°C and 3°C) were followed. During apple storage, L-asparaginase activity increases while

L-alanin α-cetoglutarate aminotransferase activity decreases. Some conclusions are drawn concerning the presence of these enzymes within apple biostructured matter and intracellular solution.

BIBLIOGRAFIE

1. E. Macovschi, V. Frunzeti, Rev. roum. Biochim., **5**, 165 (1968).
2. E. Macovschi, V. Frunzeti-Elefteresçu, St. cerc. Biochim., **12**, 115 (1969).
3. A. Mihaescu, St. cerc. biochim., **13**, 151 (1970).
4. M. Rabega, St. cerc. biochim., **15**, 87 (1972).
5. M. Rabega, St. cerc. biochim., **15**, 195 (1972).
6. C. Rabega, M. Rabega, An. Univ. Bucureşti, **20**, 93 (1971—1972).
7. E. Macovschi, *Natura şi structura materiei vii*, Editura Academiei R. S. România, Bucureşti, 1972.
8. R. Meister, P. S. Colowick, O. N. Kaplan, *Methods in enzymology*, Vol. II, Academic Press Inc. Publishers, New York, 1955, p. 383.
9. E. J. Conway, Biochem J., **27**, 430 (1933).
10. G. L. Miller, Anal. Chem., **31**, 964 (1959).
11. F. Rosen, R. N. Roberts, C. A. Nichol, J. biol. Chem., **234**, 476 (1959).

ST. CERC. BIOCHIM., 17, 1, 11—14, (1974)

INFLUENȚA INFECTĂRII CU *FUSARIUM MONILIFORME* SCHELD A UNOR LINII ȘI HIBRIZI DE PORUMB, ASUPRA SPECTRULUI IZOENZIMELOR PEROXIDAZICE

I. BRAD, MARIA TERBEA, ZOIȚA MARCU și N. HURDUC

Rezumat. — În lucrarea de față s-a studiat efectul infecției cu *Fusarium moniliforme* asupra spectrului izoenzimelor peroxidazice din plante de porumb atacate.
S-a constatat că activitatea peroxidazică din plantele infectate este modificată. Plantele rezistente infectate se caracterizează prin apariția unor benzi noi, ceea ce duce la presupunerea că aceasta reprezintă o reacție de răspuns a plantei în sensul măririi rezistenței la agentul patogen.
La formele sensibile infectate nu s-a evidențiat existența unor fracțiuni peroxidazice noi, față de cele din plantele neinfectate.

Literatura de specialitate menționează efectul diferiților agenți patogeni asupra activității enzimatice a plantei gazdă [1].

În cazul nostru, a fost studiat spectrul izoenzimelor peroxidazice, cercetările scoțînd în evidență rolul peroxidazei în procesul de rezistență al plantei și existența unor corelații directe sau inverse, între activitatea peroxidazei și rezistența sau sensibilitatea gazdei. Cercetări referitoare la izoenzime [2] — [4] au arătat că există diferențieri în ceea ce privește caracteristicile fizico-chimice ale izoenzimelor peroxidazice.

Cercetările întreprinse de noi [5] au arătat că izoenzimele se diferențiază și prin mecanismul de acțiune asupra unor substraturi, în unele cazuri constatîndu-se faptul că anumite fracțiuni izoenzimatice peroxidazice nu oxidează întotdeauna aceleași substraturi.

Studiindu-se două soiuri de cartof, rezistent și nerezistent la mană [5] s-a scos în evidență existența, la soiul rezistent, a unei fracțiuni noi ce migrează spre catod. Această fracțiune apare la soiul sensibil numai după infectare.

Existența unei fracțiuni peroxidazice în plus, a fost evidențiată și la plantele de grîu rezistente la rugini (cercetări în curs).

Alte cercetări însă, nu găsesc o corelație între spectrul izoenzimelor peroxidazice și rezistența la fuzarioză a plantelor de mazăre [6].

În lucrarea de față se expun rezultatele cercetărilor făcute pe plantule de porumb crescute din semințe infectate cu Fusarium moniliforme și pe frunze de plante infectate la înflorire.

MATERIAL ŞI METODĂ

Spectrul izoenzimelor peroxidazice s-a urmărit într-un caz la coleoptili şi rădăcinițe de plantule infectate, în vîrstă de 7 zile şi în al doilea caz, în frunzele bazale provenite din plante mature infectate. Pentru experimentare s-au folosit hibrizi şi linii ce se caracterizează prin rezistență sporită (L 46, HD 311), sau prin sensibilitate (L 13) la atacul cu Fusarium moniliforme. Seminţele au fost umectate într-o suspensie de miceliu şi spori şi puse la germinat pe hîrtie de filtru. După 7 zile s-a procedat la determinarea izoenzimelor peroxidazice utilizîndu-se metoda descrisă într-o lucrare anterioară [7].

În cel de-al doilea caz s-au folosit ca forme rezistente linia 46 şi hibridul dublu 311, iar ca forme sensibile la atacul cu Fusarium, linia 13 şi hibridul dublu 101, precum şi hibrizii simpli parentali şi hibrizilor dubli 101 şi 311. Menţionăm că liniile 13 şi 46 sînt independente de ceilalţi hibrizi şi deci au fost cultivate într-o parcelă experimentală pe sol brun roşcat de pădure. Infectarea s-a făcut în faza de înflorire a plantelor prin inocularea unei suspensii de miceliu şi conidii la baza tulpinii. S-a lucrat cu o populaţie de Fusarium moniliforme în vîrstă de 10 zile, cultivată pe mediul Csapek. Izoenzimele peroxidazice s-au determinat din frunzele bazale după 7 şi 14 zile de la infectare, utilizînd aceeaşi metodă ca mai sus.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Spectrul izoenzimelor peroxidazice al coleoptililor formelor rezistente (fig. 1) la atacul cu Fusarium moniliforme evidenţiază aspecte foarte interesante. Se constată că infecţia determină la coleoptili apariţia unei noi benzi izoenzimatice, ce migrează către polul negativ, precum şi intensificarea culorii şi apariţia de noi fracţiuni ce migrează în spre polul pozitiv (în raport cu startul). Aceasta se traduce, în ultimă instanţă, prin creşterea activităţii peroxidazice, lucru constatat dealtfel şi de alţi autori [8].

La formele neinfectate ale aceluiaşi hibrid culoarea benzilor izoenzimelor peroxidazice este mai intensă, dar numărul lor este redus în comparaţie cu formele infectate. Determinarea activităţii globale a peroxidazei la alte forme de porumb evidenţiază creşterea activităţii peroxidazice indusă de infectarea cu Fusarium (lucrări în curs de execuţie).

Linia 46, rezistentă la atacul cu Fusarium, reacţionează asemănător cu hibridul dublu 311. Se constată intensificarea culorii benzilor ce migrează către polul pozitiv, dar nu se poate vorbi de apariţia unor noi benzi electropozitive.

La linia 13 se constată de asemenea că spectrul izoenzimelor peroxidazice este modificat în sensul diminuării evidente a intensificării culorii benzilor la plantele infectate.

În rădăcinile aceleiaşi plante fenomenele sînt inversate, în sensul diminuării activităţii peroxidazei la plantele rezistente infectate şi al intensificării activităţii peroxidazei la plantele sensibile infectate.

Plantele mature au răspuns asemănător cu al plantulelor infectate.

După 7 zile de la infectare la hibrizii simpli (formele parentale ale hibridului dublu 101 (fig. 3)) se constată apariţia unei noi fracţiuni electropozitive (ultima spre catod), dar care dispare la 14 zile de la infectare. Spectrul hibridului dublu 101 este foarte asemănător aceluia al liniei 13. Infecţia diminuează activitatea peroxidazică.

După 14 zile de la infectare benzile existente în figura 3 se accentuează şi chiar apar noi benzi electronegative (fig. 4).

La hibrizii simpli, tată şi mamă ai hibridului dublu 311 infecţia intensifică evident activitatea peroxidazei (fig. 5) după 14 zile de la infectare. Se constată apariţia de noi fracţiuni peroxidazice electronegative, în timp ce activitatea peroxidazică la hibridul dublu 311 nu e afectată prea mult. Acelaşi lucru se poate spune şi despre linia 13 după 14 zile de la infectare (fig. 6).

Studiind spectrul izoenzimelor peroxidazice al miceliului de Fusarium moniliforme (fig. 7) se constată că e reprezentat prin o singură fracţiune electropozitivă foarte slabă şi o fracţiune electronegativă mai intensă.

Este discutabil dacă noua fracţiune peroxidazică ce apare la hibridul dublu 311 şi la hibrizii simpli tată şi mamă ai hibridului dublu 101 după 7 zile de la infectare, reprezintă banda proprie a miceliului de Fusarium, sau este un răspuns al plantei la infecţie, rezultanta unei hibridări între proteina plantei şi a ciupercii.

Din moment ce apare numai la o singură formă, cea rezistentă, cu toate că plantele au fost crescute în aceleaşi condiţii, considerăm întemeiată presupunerea că aceasta reprezintă o reacţie de răspuns a plantei în sensul măririi rezistenţei la agentul patogen.

Apariţia unei fracţiuni în plus are semnificaţia posibilităţilor de sinteză a unor substanţe noi în raport cu cele ce apar cînd planta este sănătoasă. Nu este exclus ca această nouă fracţiune să fie aceea care nu e inhibată de agentul patogen. Prin apariţia ei activitatea necesară desfăşurării metabolismului substanţelor ciclice nu este blocată.

Prezentat la redacţie la 1 februarie 1973

Institutul de cercetări pentru cereale şi plante tehnice Fundulea-Bucureşti

THE INFLUENCE OF *FUSARIUM MONILIFORME* SCHELD INFECTION ON THE PEROXIDASE ISOENZYMES OF DIFFERENT CORN HYBRIDS AND INBREDS

SUMMARY

In this paper the effect of infection of the maize plant with *Fusarium moniliforme* on the peroxidase isoenzymes of maize is studied.

The peroxidase activity of infected plants is modified.

The resistant infected plants have some new peroxidase fractions, that seems to be a plant reaction to *Fusarium moniliforme* infection.

The sensible infected plants have the same peroxidase fractions as the uninfected sensible plants.

BIBLIOGRAFIE

1. R. Chant, D. C. Bates, Phytochem., **9**, 2323 (1970).
2. C. R. Bhatia, Genetics, **56**, 544 (1967).
3. I. Brad, Z. Marcu, E. Moldoveanu, St. Niculescu, St. cerc. biochim., **12**, 129 (1969).
4. I. Brad, Gh. Olteanu, E. Moldoveanu, Analele ICCS, **I**, 171 (1969).
5. I. Brad, Z. Marcu, Gh. Olteanu, E. Moldoveanu, St. cerc. biochim., **13**, 19 (1970).
6. E. Clauss, Züchter, **37**, 238 (1967).
7. Z. Marcu, I. Brad, St. Niculescu, E. Moldoveanu, St. cerc. biochim., **12**, 265 (1969).
8. A. Novacky, R. E. Hampton, Phytopathol., **58**, 301 (1968).

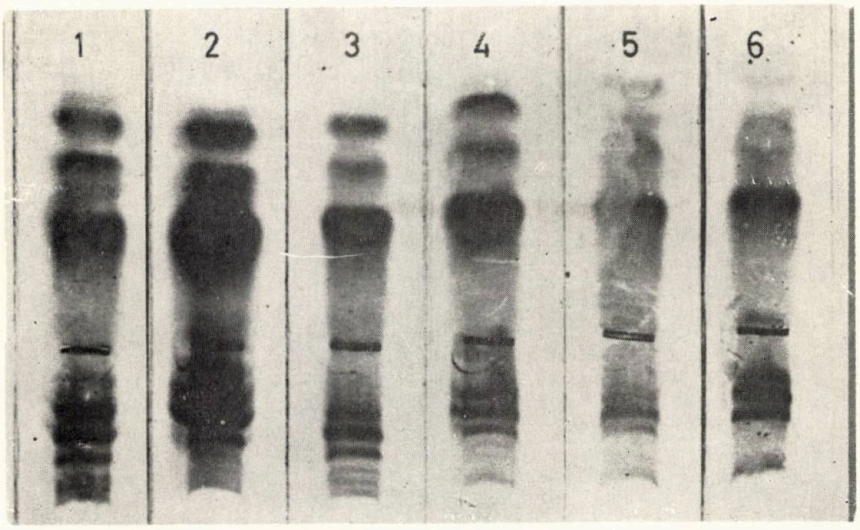


Fig. 1 — Spectrul izoenzimelor peroxidazice ale coleoptililor de porumb.

1. HD 311 infectat
2. HD neinfectat
3. L 46 infectat
4. L 46 neinfectat
5. L 13 infectat
6. L 13 neinfectat

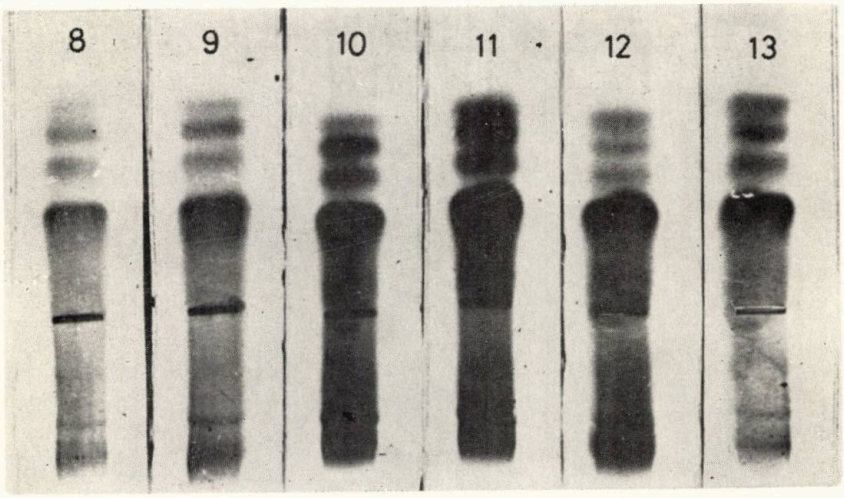


Fig. 2 — Spectrul izoenzimelor peroxidazice al rădăcinițelor de porumb.

8. HD 311 infectat
9. HD 311 neintectat
10. L 46 infectat
11. L 46 neinfectat
12. L 13 infectat
13. L 13 neinfectat

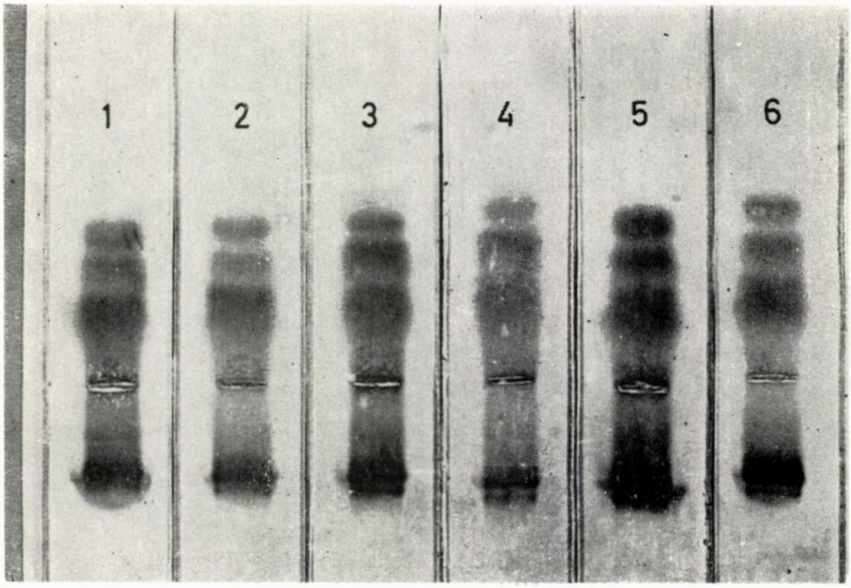


Fig. 3 — Spectrul izoenzimelor peroxidazice al frunzelor bazale de porumb după 7 zile de la infectare.

1. HS 101 (mamă) neinfestat
2. HS 101 (tată) neinfectat
3. HS 101 (mamă) infectat
4. HS 101 (tată) infectat
5. HD 101 neinfectat
6. HD 101 infectat

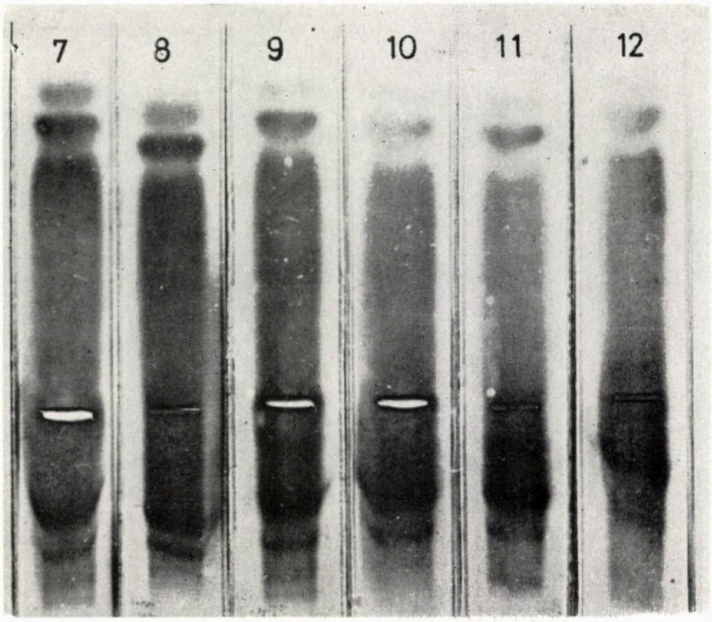


Fig. 4 — Spectrul izoenzimelor peroxidazice al frunzelor bazale de porumb după 14 zile de la infectare.

7. HS 101 (mamă) neinfectată
8. HS 101 (tată) neinfectat
9. HS 101 (mamă) infectat
10. HS 101 (tată) infectat
11. HD 101 neinfectat
12. HD 101 infectat

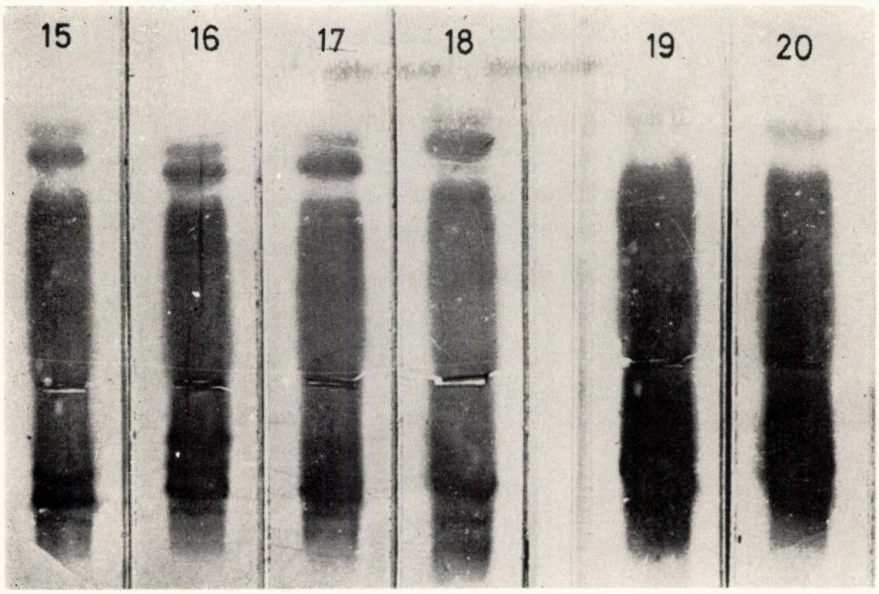


Fig. 5 — Spectrul izoenzimelor peroxidazice al frunzelor bazale de porumb după 14 zile de la infectare.

15. HS 311 (tată) neinfectat
16. HS 311 (tată) infectat
17. HS 311 (mamă) neinfectat
18. HS 311 (mamă) infectat
19. HD 311 neinfectat
20. HD 311 infectat

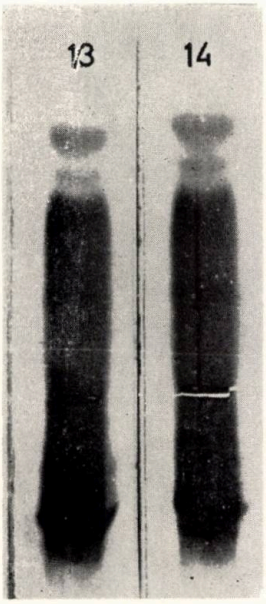


Fig. 6 — Spectrul izoenzimelor peroxidazice al frunzelor bazale de porumb după 14 zile de la infectare.

13. L. 13 neinfectat
14. L. 13 infectat

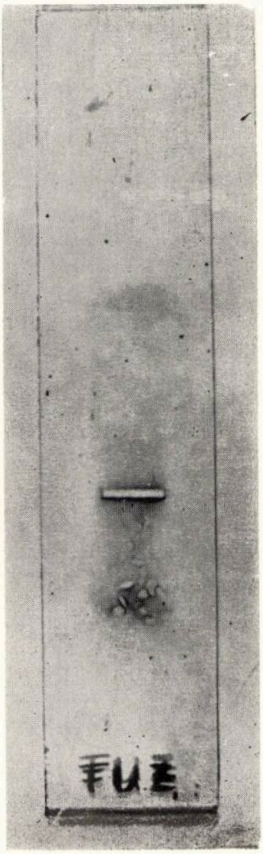


Fig. 7. Spectrul izoenzimelor peroxidazice al micheliului de FUSARIUM MONILIFORME

ST. CERC. BIOCHIM., 17, 1, 15–23, (1974)

INFLUENȚA UNOR DERIVAȚI SULFONAMIDAȚI AI ACIZILOR CLOR-FENOXIACETICI ȘI CLOR-FENOXIPROPIONICI ASUPRA ACTIVITĂȚII PENICILINAZEI

LUMINIȚA JERCA, VLAD ARTENIE și LEONID ABABEI

Rezumat. — S-a studiat influența a cincisprezece derivați sulfonamidați ai acizilor clor-fenoxiacetici și clor-fenoxipropionici asupra activității penicilinazei. Derivații ce conțin în poziția orto un ciclu benzenic, ca al doilea substituent, au un efect inhibitor mai accentuat asupra activității enzimei decît derivații folosiți pentru comparare.

Una din problemele actuale de mare importanță practică este studiul interacțiunii penicilinazei cu diferite substanțe, adică studiul capacității acestora de a inhiba activitatea enzimei.

Se știe că penicilinaza sau β-lactamaza(E.C.3.5.2.6.)enzimă indusă, produsă de bacteriile B. cereus, B. subtilis, E. coli, cînd acestea sînt cultivate pe medii ce conțin ca inductor penicilina în doză inferioară celei bacteriostatice, catalizează hidroliza legăturii amidice din inelul β-lactamic al moleculei acestui antibiotic [1], [2], [3].

Bazîndu-ne pe cercetările anterioare prin care am constatat că unii derivați sulfonamidați ai acizilor clor-fenoxiacetici și clor-fenoxipropionici, influențează in vitro activitatea unor enzime vegetale [4], încercăm să studiem acțiunea unor noi derivați din această clasă, asupra activității penicilinazei în procesul de scindare a penicilinei G.

MATERIAL ȘI METODĂ DE CERCETARE

S-au supus experimentării 15 derivați sulfonamidați ai acizilor clor-fenoxiacetici și clor-fenoxipropionici, sintetizați în Laboratorul de tehnologie a produselor farmaceutice, Institutul Politehnic Iași [5], [8]. Formula brută și denumirea chimică a derivaților, sub formă de sare de sodiu, sînt redate în tabelul nr. 1.

S-a studiat de asemenea acțiunea asupra activității penicilinazei, a trei compuși clasici, apropiați ca structură chimică de noii derivați, sarea de sodiu a acidului 2,4-diclor-fenoxiacetic sau 2,4—D, acidul fenoxiacetic și acidul β-naftoxiacetic.

Tabelul 1

Formula brută și denumirea chimică a compușilor experimentați

Nr. crt.	Formula brută	Denumirea chimică	
		a) Substanțe sintetizate	
1	2	3	
S_1	$C_8H_8O_5N\ S\ Cl\ Na$	Sarea de sodiu a acidului	2-Cl-4-amidosulfonil-fenoxiacetic
S_2	$C_8H_8O_5N\ S\ Cl\ Na$	Sarea de sodiu a acidului	3-Cl-4-amidosulfonil-fenoxiacetic
S_3	$C_8H_8O_5N\ S\ Cl\ Na$	Sarea de sodiu a acidului	4-Cl-2-amidosulfonil-fenoxiacetic
S_4	$C_{14}H_{10}O_5N\ S\ Cl_2Na$	Sarea de sodiu a acidului	4-Cl-2(meta-Cl-fenil-amidosulfonil)-fenoxiacetic
S_5	$C_{14}H_{10}O_5N\ S\ Cl_2Na$	Sarea de sodiu a acidului	4-Cl-2(para-Cl-fenil-amidosulfonil)-fenoxiacetic
S_6	$C_9H_{11}O_5N\ S\ Na$	Sarea de sodiu a acidului	2-metil-4-amidosulfonil-fenoxiacetic
S_7	$C_{15}H_{13}O_5N\ S\ Cl\ Na$	Sarea de sodiu a acidului	2-metil-4(meta-Cl-fenil-amidosulfonil)-fenoxiacetic
S_8	$C_{15}H_{13}O_5N\ S\ Cl\ Na$	Sarea de sodiu a acidului	2-metil-4(para-Cl-fenil-amidosulfonil)-fenoxiacetic
S_9	$C_9H_{10}O_5N\ S\ Cl\ Na$	Sarea de sodiu a acidului	2-Cl-4-amidosulfonil-fenoxipropionic
S_{10}	$C_9H_{10}O_5\ N\ S\ Cl\ Na$	Sarea de sodiu a acidului	3-Cl-4-amidosulfonil-fenoxipropionic
S_{11}	$C_9H_{10}O_5N\ S\ Cl\ Na$	Sarea de sodiu a acidului	4-Cl-2-amidosulfonil-fenoxipropionic
S_{12}	$C_{15}H_{12}O_5N\ S\ Cl_2Na$	Sarea de sodiu a acidului	4-Cl-2(meta-Cl-fenil-amidosulfonil)-fenoxipropionic
S_{13}	$C_{10}H_{13}O_5N\ S\ Cl\ Na$	Sarea de sodiu a acidului	2-metil-4-amidosulfonil-fenoxipropionic
S_{14}	$C_{16}H_{15}O_5N\ S\ Cl\ Na$	Sarea de sodiu a acidului	2-metil-4(meta-Cl-fenil-amidosulfonil)-fenoxipropionic
S_{15}	$C_{16}H_{15}O_5N\ S\ Cl\ Na$	Sarea de sodiu a acidului	2-metil-4(para-Cl-fenil-amidosulfonil)fenoxipropionic
		b) compuși clasici	
S_{16}	$C_8H_8O_3$	Acid fenoxiacetic	
S_{17}	$C_8H_5O_3Cl_2Na$	Sarea de sodiu a acidului	2,4-diclor-fenoxiacetic
S_{18}	$C_{12}H_9O_3$	Acid β-naftoxiacetic	

Influența compușilor asupra activității enzimei a fost cercetată la trei concentrații, 10^{-2}, 10^{-4} și 10^{-6} molar.

Experiențele au fost efectuate *in vitro* cu preparate enzimatice purificate și liofilizate de penicilinază, provenită de la Institutul de Microbiologie „Dr. I. Cantacuzino" București. Preparatul, înfiolat, conținînd 1000 unități penicilinază/fiolă (o unitate penicilinază fiind cantitatea minimă de enzimă, capabilă să distrugă 100 U.I. penicilină în timp de o oră la 37°C și la pH 7,0 — 7,2), a fost solvit în momentul întrebuințării, în 10 ml soluție tampon fosfat M/15, pH 7,0.

Ca substrat s-a întrebuințat penicilina G, sub formă de sare de potasiu, produsă de Fabrica de antibiotice Iași.

Activitatea penicilinazei s-a determinat după metoda Ciaikovskaia [9], adaptată de noi pentru produșii analizați, dozînd iodometric cantitatea de penicilină G inactivată de enzimă în timp de o oră la 37°C și la pH 7,0.

Pentru fiecare probă de cercetat s-a efectuat un martor în care nu s-a adăugat substanță. Rezultatele obținute sînt exprimate în procente (%) față de martorul luat drept 100%.

Rezultatele obținute în determinările efectuate, au fost prelucrate statistic, calculîndu-se media aritmetică a 5—10 valori apropiate, exceptînd valorile extreme, și deviația standard $\mp$ SD, după Rapoport [10]. Variațiile înregistrate la toate experiențele nu au depășit deviația standard de $\mp$0,15. Cu datele prelucrate statistic s-au construit graficele, care stau la baza interpretării rezultatelor obținute.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Pentru standardizarea preparatelor de penicilinază, s-au studiat în primul rînd unele aspecte cinetice ale reacției catalizată de această enzimă. În acest scop s-au determinat influențele concentrației enzimei, a concentrației substratului și a timpului de incubare asupra activității penicilinazei.

S-a constatat că pentru concentrații de 0 — 50 unități de penicilinază în probă, există o proporționalitate directă între concentrația enzimei și cantitatea de penicilină scindată (fig. 1)

Dependența vitezei reacției catalizate de enzimă, de concentrația substratului (fig. 2) este o curbă cu aspect hiperbolic, care arată că activitatea penicilinazei crește proporțional cu creșterea concentrației substratului, atingînd valoarea maximă la aproximativ 8 mg penicilină în proba de cercetat, apoi cantitatea de penicilină scindată rămîne constantă.

S-a observat de asemenea că activitatea enzimei este direct proporțională cu timpul de incubare în primele 60 minute (fig. 3).

Ca urmare a celor trei aspecte cinetice studiate, determinarea influenței compușilor sintetizați asupra activității penicilinazei, s-a executat în următoarele condiții:

— o concentrație a enzimei de 20 unități enzimă în probă (0,2 ml soluție tampon fosfat-enzimă cu o concentrație de 100 unități enzimă/ml soluție).

— o concentrație a substratului de 12 mg penicilină G în probă, ce corespunde saturării și asigură o activitate maximă plafonată a enzimei.

— un timp de incubare limitat la 60 minute.

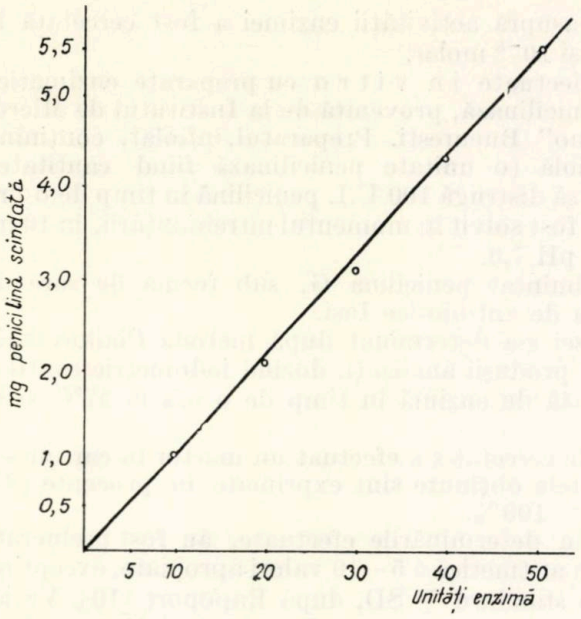


Fig. 1. — Influența concentrației penicilinazei asupra vitezei reacției de descompunere a penicilinei

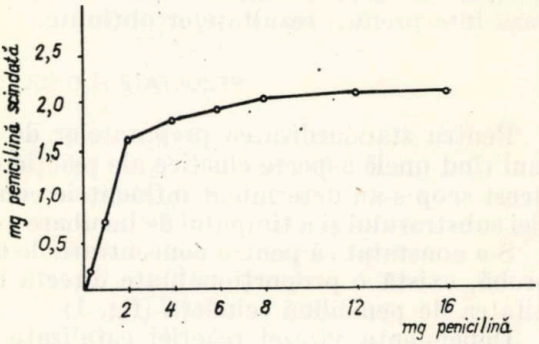


Fig. 2. — Influența concentrației penicilinei asupra activității penicilinazei

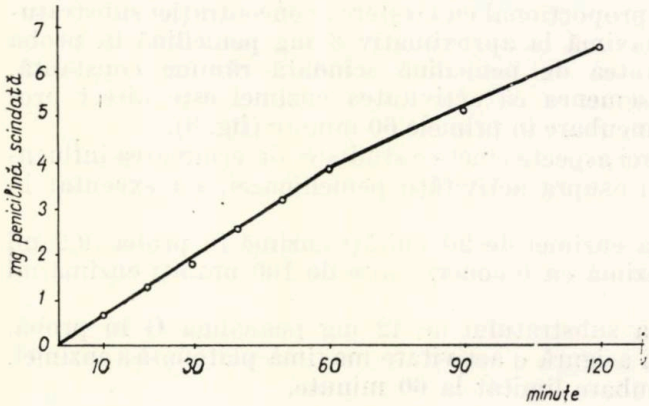


Fig. 3. — Influența timpului de incubare asupra scindării penicilinei sub acțiunea penicilinazei

Cercetările efectuate arată că cei 15 derivați sulfonamidați cît și cei trei compuși clasici analizați, influențează în mod diferit, in vitro, activitatea penicilinazei.

Se observă că acțiunea stimulatoare a compușilor din clasa acizilor clor-fenoxiacetici sulfonamidați asupra activității penicilinazei, descrește cînd concentrația scade de la 10^{-2} la 10^{-6} M, pentru substanțele S_1, S_2 și S_3, odată cu migrarea clorului în poziția para (fig. 4).

Introducerea celui de-al doilea ciclu benzenic halogenat, în poziția orto față de gruparea metoxi-carboxilică, face ca substanțele S_4 și S_5 să inhibe activitatea penicilinazei la aceste concentrații (fig. 4). Gradul de inhibare este mult mai accentuat decît al compușilor clasici, a căror acțiune este redată în fig. 8.

Compușii din clasa acizilor clor-fenoxipropionici sulfonamidați au efect inhibitor asupra activității enzimei numai la concentrația de 10^{-2} M, acesta fiind mai pronunțat la derivatul S_{12} (fig. 5). Se observă că acest compus conține clorul, ca și derivații S_4 și S_5, în poziția para față de gruparea metoxi-carboxilică, cît și un al doilea ciclu benzenic halogenat.

Introducerea grupării metil în locul clorului din poziția orto față de gruparea metoxi-carboxilică, atenuează efectul inhibitor asupra activității penicilinazei (fig. 6 și fig. 7).

Substanța S_{13} manifestă chiar un ușor efect stimulator. De asemenea introducerea, în compuși, a celui de al doilea ciclu benzenic halogenat, substanțele S_7, S_8 și S_{14}, S_{15}, a dus la o stimulare descrescîndă a activității enzimei odată cu scăderea concentrației efectorului.

Din datele experimentale prezentate se poate trage concluzia că substanțele S_4, S_5 și S_{12}, care conțin un al doilea ciclu benzenic clorurat în poziția meta sau para, ciclu aflat în poziția orto față de gruparea metoxi-carboxilică, au un efect inhibitor asupra activității penicilinazei. Acest efect este mai accentuat decît cel al compușilor clasici S_{16}, S_{17} și S_{18}.

Derivații care conțin o grupare metil în poziția orto, au un efect inhibitor sau stimulator neînsemnat asupra activității enzimei. Compușii cu un al doilea ciclu meta sau para clor substituit, exercită un ușor efect stimulator la concentrația de 10^{-2} și 10^{-4} M și practic nu influențează activitatea penicilinazei la concentrația de 10^{-6} M.

CONCLUZII

Rezultatele cercetărilor arată că derivații sulfonamidați ai acizilor clor-fenoxiacetici și clor-fenoxipropionici cît și compușii clasici analizați, influențează în mod diferit in vitro activitatea penicilinazei.

Substanțele care conțin în poziția orto față de gruparea metoxi-carboxilică, un al doilea ciclu benzenic clorurat în poziția meta sau para, au un efect inhibitor mai accentuat la concentrația de 10^{-2} M, asupra activității penicilinazei.

Efectul de inhibare a activității penicilinazei de către compușii experimentați este superior efectului corespunzător compușilor clasici analizați.

Prezentat la redacție la 1 martie 1973

Laboratorul de biochimie, Institutul de medicină și farmacie
și
Laboratorul de biochimie, Universitatea „Al. I. Cuza" Iași

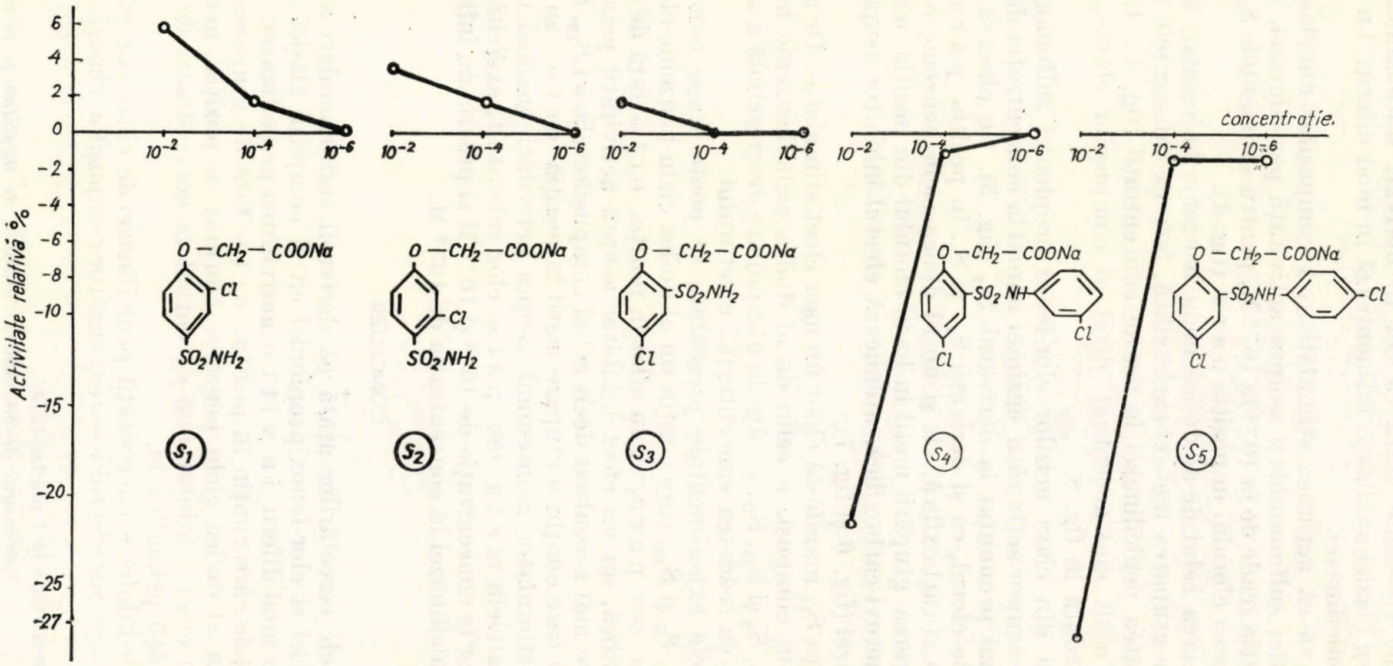


Fig. 4. — Influența derivaților clor-fenoxiacetici sulfonamidați asupra activității penicilinazei

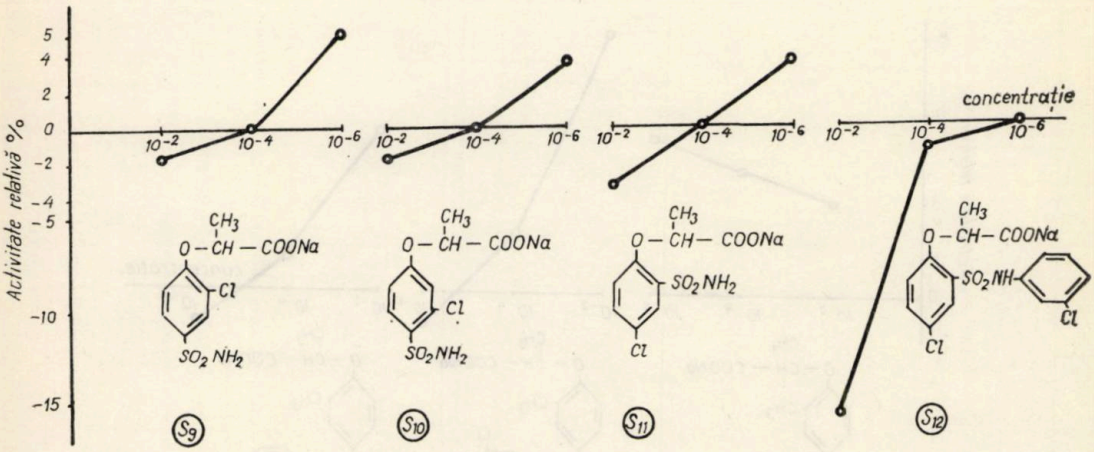


Fig. 5. — Influenţa derivaţilor clor-fenoxipropionici sulfonamidaţi asupra activităţii penicilinazei

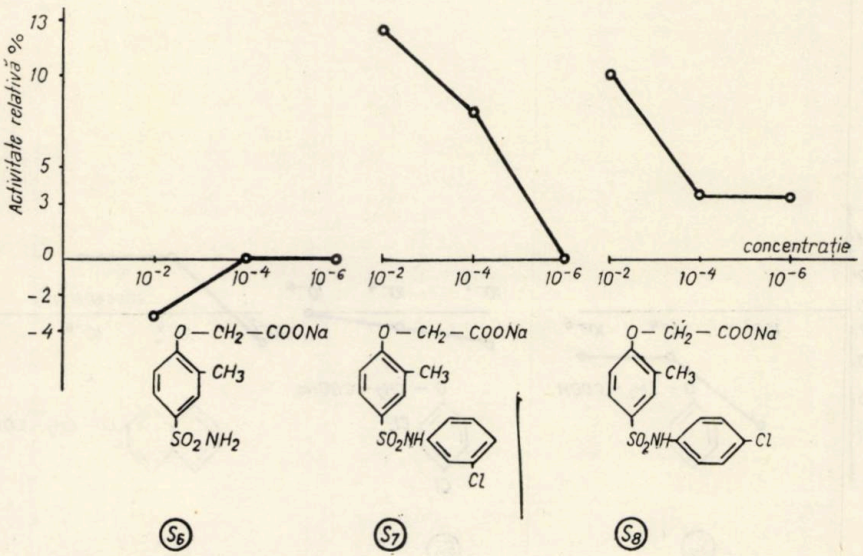


Fig. 6. — Influenţa derivaţilor o r t o-metil-fenoxiacetici-4-sulfonamidaţi asupra activităţii penicilinazei

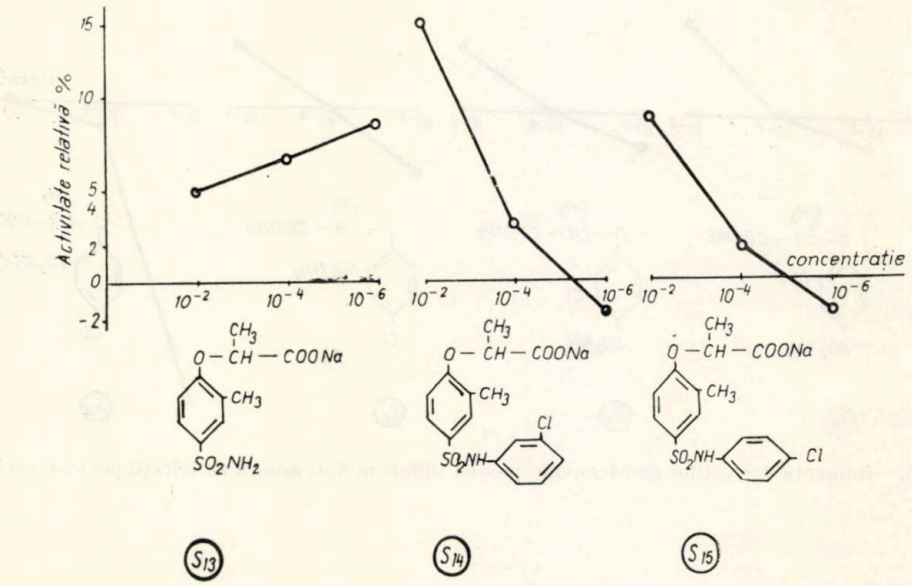


Fig. 7. — Influenţa derivaţilor o r t o-metil-fenoxipropionici-4-sulfonamidaţi asupra activităţii penicilinazei

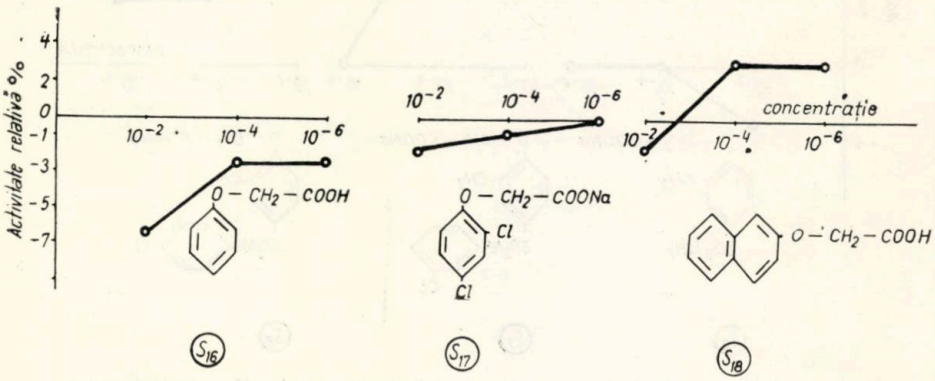


Fig. 8. — Influenţa derivaţilor clasici asupra activităţii penicilinazei

THE INFLUENCE OF SOME SULFONAMIDE DERIVATIVES OF CHLORO-PHENOXYACETIC ACID AND CHLORO-PHENOXYPROPIONIC ACID ON PENICILLINASE ACTIVITY

SUMMARY

The influence of 15 chloro-phenoxyacetic acid and chloro-phenoxypropionic acid sulfonamide derivatives on the activity of penicillinase was studied. Those derivatives, which contain, in *ortho* position, a second substituted benzene ring, have shown a stronger inhibitory effect on the activity of the enzyme, than the classical derivatives used for comparision.

BIBLIOGRAFIE

1. I. Vasilescu, *Enzimele*, Ed. Academiei, Bucureşti, 1960, p. 246.
2. I. Vasilescu, *Tehnologia şi aplicaţiile industriale ale enzimelor*, Ed. tehnică, Bucureşti, 1963, p. 161.
3. P. Abraham, E. Chain, Nature, 837 (1940).
4. V. Artenie, L. Jerca, Gh. Botez, Bul. Instit. Politeh. Iaşi, *3—4*, 133 (1973).
5. Gh. Botez, Chem. Abstr., **57**, 14984 (1962).
6. Gh. Botez, C. Oniscu, Bul. Inst. Politeh., Iaşi, **15**, 124 (1969).
7. Gh. Botez, C. Oniscu, E. Merica, C. Gorea, Bul. Instit. Politeh., Iaşi **13**, 257 (1967).
8. Gh. Botez, C. Oniscu, C. Gorea, E. Merica, L. Jerca, Brevet de invenţie, RSR, 66593, /10.V.1971.
9. C. M. Ciaikovskaia, T. Venkina, Antibiotiki, **5**, 453 (1962).
10. S. Rapoport, H. J. Raderecht, Physiol. Chem. Prakt., Volk und Gesundheit Verlag, Berlin, 1965, p. 100.

ST. CERC. BIOCHIM., 17, 1, 25–30 (1974)

INFLUENȚA MOLIBDENULUI ASUPRA FOSFORILĂRII OXIDATIVE ȘI ACTIVITĂȚII SUCCINATDEHIDROGENAZEI ÎN MITOCONDRII DIN ORGANE DE DIFERITE VERTEBRATE

VALENTINA JURCĂ

Rezumat. — S-a cercetat acțiunea molibdenului, în concentrații variabile, asupra metabolismului energetic și activității succinatdehidrogenazei din mitocondriile hepatice de pești și din cele hepatice și cerebrale de șobolan. S-a stabilit că acest metal acționează, în general, ca stimulator în concentrații mici și ca inhibitor în concentrații mari, asupra respirației, fosforilării și activității enzimatice, însă sensul acțiunii se manifestă la concentrații diferite în funcție de natura mitocondriei. Se discută semnificația rezultatelor obținute.

Prezența molibdenului în organismele vii, precum și acțiunea sa asupra metabolismului a preocupat pe mulți cercetători, sub aspect biologic [1] — [4], farmacologic [5] — [10] și toxicologic [11]. Interesul față de această problemă este justificat pe de o parte de faptul că, molibdenul s-a dovedit a fi un element indispensabil nutriției animalelor, dar pe de altă parte, absorbit în cantitate mare cu hrana, devine toxic.

Este stabilit [12] — [17] că molibdenul se găsește în mod normal în organe și țesuturi, atît la om cît și la diverse specii de animale, însă în cantități variabile. Cele mai mari concentrații au fost semnalate în ficat; Bunkman [18] găsește că din molibdenul conținut de celula hepatică, 70% aparține citoplasmei și 30% nucleului. Unele cercetări [1] — [3] identifică acest element ca fiind integrat în structura xantinoxidazei. Nicholas [19] a observat că, după dializă, xantinoxidaza rămîne capabilă de a oxida hipoxantina dependent de acceptorul albastru de metilen, dar nu mai face posibil transferul de electroni pe fericianura de potasiu sau pe citocromul c. Alți cercetători semnalează interferența molibdenului cu metabolismul purinelor [20], al glucidelor [21] și cu al unor metale cum sînt zincul [22], cuprul [23], calciul [24]. Underword (citat de 11) constată că unele specii de animale se comportă diferit față de dozele mari de molibden, iar Karantassis, Angoli și Lampe (citați de 11) stabilind dozele letale ale acestui element la cobai, broască și cîine, pun în evidență variația lor cu specia.

Din cele cîteva exemple menționate reiese că influența molibdenului asupra organismelor ridică probleme ce preocupă pe mulți cercetători din diferite domenii, însă datele obținute în condiții experimentale variate nu oferă o imagine clară și unitară a mecanismului de acțiune și a interferențelor metabolice, în special la dozele mici ale acestui element.

În această lucrare ne-am propus să urmărim influenţa molibdenului asupra metabolismului energetic şi să precizăm dacă comportarea acestui metal în funcţie de concentraţie este diferită de la specie la specie şi de la organ la organ. În acest scop s-a investigat, mai întîi in vitro, influenţa ionilor de molibden asupra fosforilării oxidative din mitocondrii separate din organele unor vertebrate situate pe trepte diferite de evoluţie, peşti şi mamifere. Concomitent s-a cercetat acţiunea acestui element şi asupra activităţii succinatdehidrogenazei. Aceste cercetări se încadrează în preocupările noastre referitoare la unele aspecte ale interferenţei molibdenului cu unele metabolisme, reprezentînd de fapt o continuare a cercetărilor anterioare [25] — [27].

MATERIAL ŞI METODE

S-a lucrat pe mitocondrii de ficat de păstrăv (Salmo gairdneri) în greutate de 300 — 350 g şi pe mitocondrii de ficat şi de creier de şobolan (linia Gustav) în greutate de 200 — 250 g. Transportarea peştilor la laborator şi separarea mitocondriilor de ficat s-a făcut similar procedeelor descrise într-o lucrare anterioară [28]. Pentru obţinerea mitocondriilor de creier s-a utilizat aceeaşi tehnică, numai că separarea s-a realizat la 12000 × g.

Proteinele mitocondriale au fost dozate prin metoda Lowry [29], fosfatul anorganic a fost determinat cu ajutorul metodei Fiske-Subbarow [30]. Consumul de oxigen s-a măsurat cu tehnica manometrică Warburg. Mediul de reacţie (2 ml) cuprindea 0,01 M succinat ca substrat; fosfat monopotasic, pH = 7,4, 15 mM; EDTA 1 mM; zaharoză 0,1 M; glucoză 30 mM; hexokinază 200—300 unităţi KM; ATP 1 mM; 7—8 mg proteină mitocondrială, 14 mM KF; molibden sub formă de molibdat de amoniu în cantităţi variabile (0,005 mM — 20 mM). Faza gazoasă a fost aerul, bioxidul de carbon a fost absorbit cu 0,2 ml hidroxid de potasiu 20%, care era pus în centrul cuvelor. Activitatea succinatdehidrogenazei s-a determinat manometric cu metoda Warburg, folosind tehnica descrisă de Schneider şi Potter [31]. Amestecul de reacţie (2 ml) conţinea : succinat de sodiu 0,5 mM; tampon fosfat de potasiu pH = 7,4, 20 mM ; clorură de aluminiu şi clorură de calciu 0,002 mM; citocrom c 0,02 mM; 5 mg proteină mitocondrială, molibden în concentraţiile amintite mai sus sub formă de molibdat de amoniu. Timpul de incubare pentru determinarea respiraţiei, fosforilării şi activităţii succinatdehidrogenazei a fost 30 min. la temperatura de 36°C, pentru mitocondriile de ficat şi de creier de şobolan, şi de 20°C pentru cele de păstrăv.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Din analiza datelor prezentate în tabela 1 se constată că molibdenul, în anumite limite ale concentraţiilor experimentate de noi, nu a exercitat nici o acţiune asupra consumului de oxigen (Δ O) şi a esterificării fosfatului anorganic (Δ P) din mitocondrii, iar în unele concentraţii a activat sau a inhibat aceste procese de importanţă primordială pentru viaţa celulară.

Tabela 1

Influența molibdenului asupra fosforilării oxidative din mitocondriile de ficat de pești (a), de ficat (b) și de creier (c) de șobolan*)

Concentrația molibdenului (mM)	*a*			*b*			*c*		
	ΔP[1]	ΔO[2]	P/O	ΔP[1]	ΔO[2]	P/O	ΔP[1]	ΔO[2]	P/O
—	1,69 ±0,011 (I)	1,02 ±0,006 (I′)	1,65 ±0,005	2,90 ±0,007 (I)	1,67 ±0,009 (I′)	1,72 ±0,003	2,08 ±0,010 (I)	1,58 ±0,006 (I′)	1,31 ±0,004
0,005	1,68 ±0,008	1,03 ±0,005	1,63 ±0,007	2,88 ±0,005	1,68 ±0,003	1,71 ±0,005	2,10 ±0,009	1,57 ±0,007	1,33 ±0,006
0,010	1,83 ±0,005 (II)	1,10 ±0,004 (II′)	1,66 ±0,006	2,93 ±0,010	1,67 ±0,005	1,75 ±0,006	2,05 ±0,013	1,56 ±0,003	1,31 ±0,004
0,025	1,85 ±0,010 (III)	1,10 ±0,008 (III′)	1,68 ±0,003	2,89 ±0,009	1,69 ±0,006	1,71 ±0,002	1,99 ±0,009	1,53 ±0,005	1,30 ±0,007
0,050	1,89 ±0,006 (IV)	1,12 ±0,005 (IV′)	1,68 ±0,007	2,92 ±0,009	1,69 ±0,006	1,72 ±0,005	2,02 ±0,011	1,55 ±0,010	1,30 ±0,005
0,10	0,94 ±0,012	0,58 ±0,009	1,62 ±0,002	2,87 ±0,006	1,64 ±0,008	1,73 ±0,004	2,25 ±0,007 (II)	1,67 ±0,005 (II′)	1,34 ±0,003
0,50	0,93 ±0,009	0,57 ±0,012	1,63 ±0,005	2,86 ±0,012	1,67 ±0,006	1,72 ±0,006	2,20 ±0,008 (III)	1,68 ±0,003 (III′)	1,30 ±0,004
1,00	0,50 ±0,007	0,31 ±0,006	1,61 ±0,003	3,10 ±0,009 (II)	1,80 ±0,004 (II′)	1,72 ±0,002	1,65 ±0,008	1,29 ±0,009	1,27 ±0,006
2,50	0,34 ±0,011	0,21 ±0,009	1,61 ±0,006	3,09 ±0,005 (III)	1,81 ±0,005 (III′)	1,70 ±0,006	0,72 ±0,004	0,57 ±0,002	1,26 ±0,006
5,00	0,00	0,12	—	±3,12 ±0,007 (IV)	1,79 ±0,005 (IV′)	1,74 ±0,008	0,00	0,20	—
10,00	0,00	0,00	—	1,88 ±0,010	1,14 ±0,009	1,64 ±0,005	0,00	0,00	—
20,00	0,00	0,00	—	0,00	0,26	—			

x) Rezultatele reprezintă media a 8-9 determinări

1) μ moli P/mg prot./h

2) μ atom 0/mg prot./h

Semnificația diferenților

ΔP(*a*,*b*,*c*) între (I) și (II) p<o.01; (I) și (III) p<0,01; (I) și (IV) p<0,01

și Δ0(*a*,*b*,*c*) între (I′) și (II′) p<0,01; (I′) și (III′) p<0,01; (I′) și (IV′) p<0,01

De remarcat este că augumentarea şi inhibarea parţială şi totală a oxidoreducerii celulare şi a fosforilării de către acest element se manifestă la concentraţii diferite în funcţie de natura mitocondriei. Astfel, molibdenul a stimulat oxidarea succinatului şi fosforilarea ADP-lui la ATP, în mitocondriile hepatice de peşti, în concentraţii inferioare celor din mitocondriile hepatice de şobolan, iar în cele cerebrale de şobolan în concentraţii intermediare acestora. Concentraţiile inhibitoare prezintă de asemenea limite variabile, în funcţie de proveniența mitocondriei. În mitocondriile de ficat de peşti şi de creier de şobolan, diminuarea parţială sau totală a respiraţiei şi fosforilării de către molibden a avut loc la concentraţii mai scăzute în raport cu cele din mitocondriile de ficat de şobolan.

În cercetări anterioare [28], s-au semnalat unele caracteristici ale mitocondriilor hepatice de peşti. Cu această ocazie s-a arătat că acestea, în comparaţie cu mitocondriile hepatice de mamifere, s-au dovedit a fi mai puţin stabile, iar adăugarea citocromului c în mediul de incubare creşte oxidarea succinatului şi stimulează fosforilarea, în timp ce în cazul mitocondriilor hepatice de şobolan adăugarea citocromului c nu este esenţială. Avînd în vedere aceste constatări, se pare că sensibilitatea metabolică diferenţiată a mitocondriilor faţă de molibden se datoreşte unor modificări de ultrastructură ce caracterizează stadiile respiratorii la diferite specii de mitocondrii [32], cît şi faptului că transportul energiei în sistemul membranos este însoţit de aranjamente particulare ale configuraţiei cristelor [33].

Faptul că molibdenul în anumite concentraţii stimulează sau inhibă respiraţia şi fosforilarea, fără să modifice semnificativ raportul P/O, sugerează că acţiunea acestui element interferează cu activitatea enzimelor implicate în catena respiratorie furnizoare de energie. În acest sens ne-am propus să urmărim comportarea succinatdehidrogenazei faţă de

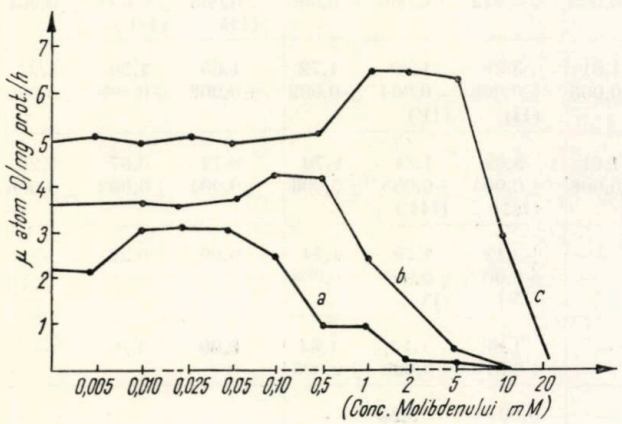


Fig. 1 — Influenţa molibdenului asupra activităţii succinatdehidrogenazei din mitocondriile hepatice de peşti (*a*), de creier (*b*) şi hepatice (*c*) de şobolan.

acest metal. Activitatea acestei enzime din mitocondriile hepatice de peşti şi din cele hepatice şi cerebrale de şobolan în funcţie de concentraţia molibdenului adăugat în mediul de incubare este reprezentată în figura 1. Aspectul curbelor activităţii succinatdehidrogenazei arată că acţiunea molibdenului asupra activităţii enzimatice este practic similară cu cea

observată asupra respiraţiei şi fosforilării mitocondriilor. Astfel, activitatea succinatdehidrogenazei din mitocondriile de ficat de peşti se modifică sub acţiunea molibdenului la concentraţii mai mici în comparaţie cu cea din mitocondriile de ficat de şobolan. Susceptibilitatea diferenţiată a modificărilor activităţii enzimatice din mitocondriile hepatice de diferite vertebrate faţă de concentraţii egale de molibden indică existenţa unei marcate variabilităţi de specie a anumitor proprietăţi moleculare ale protein-enzimei. Este de asemenea demn de relevat faptul că potenţarea şi inhibarea activităţii succinatdehidrogenazei hepatice de şobolan are loc la concentraţii de molibden net diferite de cele care exercită o acţiune similară asupra enzimei din mitocondriile de creier ale aceleiaşi specii. Din acest motiv se poate afirma că succinatdehidrogenaza, care catalizează acelaşi tip de reacţie în ambele forme de mitocondrii, posedă anumite caracteristici moleculare specifice.

CONCLUZII

— Molibdenul adăugat în mediul de incubare a mitocondriilor din organe de diferite vertebrate acţionează, în funcţie de concentraţia sa, ca stimulator sau ca inhibitor al respiraţiei şi fosforilării ADP-ului. Acţiunea sa de augumentare şi de depresare parţială sau totală a acestor procese se manifestă la diferite concentraţii ce prezintă o pronunţată variabilitate în funcţie de natura mitocondriei, legată de specie şi organ. Aceasta atestă deosebiri de ultrastructură şi de configuraţia cristelor de mitocondrii.

— Modificările produse asupra activităţii succinatdehidrogenazei din mitocondrii de concentraţii egale de molibden prezintă de asemenea diferenţe în funcţie de specie şi organ, fapt ce indică existenţa unor caracteristici moleculare specifice ale protein-enzimei.

Prezentat la redacţie la 16 august 1973

Laboratorul de biochimie
Universitatea „Al. I. Cuza"
Iaşi

THE INFLUENCE OF MOLYBDENUM ON THE OXIDATIVE PHOPHORYLATION AND ON SUCCINATE DEHYDROGENASE ACTIVITY IN MITOCHODRIA FROM ORGANS IN DIFFERENT VERTEBRATES

SUMMARY

It is established that molybdenum, in some ranges of concentrations, is interfering with the respiration, the phosphorylation of ADP and the activity of succinate-dehydrogenase from mitochondria.

Its stimulatory or inhibitory effect on these metabolic stages as well as its enzymatic activity are present at different concentrations in hepatic mitochondria of fish (*Salmo gairdneri*) and in liver and brain mitochondria of mammalia (rats). The significance of results is discussed.

BIBLIOGRAFIE

1. E. C. De Renzo, Arch. Biochem. Biophys., **45**, 247 (1953).
2. E. C. De Renzo, J. Chem. Soc., **75**, 753 (1953).
3. D. A. Richert, W. W. Westerfeld, J. Biol. Chem., **203**, 915 (1953).
4. D. Paul Leopore, R. F. Miller, Fed. Proc., **20**, 296 (1961).
5. F. Coujolle, D. Meyneer, Toulouse Medicale, **52**, 741 (1951).
6. R. Danty, Thése Pharmacie, Toulouse (1953).
7. N. Castellino, Folia Medica (Naples), **38**, 201 (1935).
8. S. Cognetti, M. Pesa, Arch. Maraglino Pat. Clin., **15**, 1035 (1959).
9. K. Schawarz, Nature, **183**, 742 (1959).
10. P. Alder, Odontologisk revy, **8**, 202 (1957).
11. L. Vignoli, J. P. Defretin, Biol. Médicale, **LII**, 319 (1963).
12. Ter Mulen, Rev. Tra. Chim. P. B., **51**, 543 (1932).
13. Ter Mulen, Nature (London), **130**, 966 (1932).
14. D. Bertrand, C. R. Acad. Sci., **215**, 590 (1932).
15. D. Bertrand, Bull. Soc. Chim. Biol., (Paris), **25**, 197 (1943).
16. T. A. Bru, Y. Bru, C. R. Acad. Sci., **237**, 279 (1953).
17. B. I. Reid, R. E. Davis, J. R. Couch, Fed. Proc., **17**, 294 (1958).
18. G. L. Bunkman, Proc. Soc. Exp. Biol., **107**, 666 (1969).
19. D. J. Nicholas, A. Nason, J. Biol. Chem., **207**, 353 (1954).
20. E. V. Gusev, Ghigh. i Sanit., **9**, 63 (1969).
21. F. I. Berenstein, S. V. Sapojcov, V. N. Holod, Nauchin. Dokl. Vysshey Skoly Biol. Nauk, **1**, 70 (1966).
22. V. M. Holod, G. E. Spak, Khimizatsia Selsk. Khoz., **6**, 699 (1968).
23. A. T. Dick, Soil Science, **81**, 229 (1956).
24. J. L. Evans, G. K. Davis, J. Animal Sci., **25**, 1010 (1966).
25. V. Jurcă, D. Matei, An Șt. Univ. Iași, s 1 c, **XIII**, 115 (1967).
26. V. Jurcă, D. Matei. An. Șt. Univ. Iași, s l c, **XIII**, 213 (1967).
27. V. Jurcă, An. Șt. Univ. Iași, s l c, **XIV**, 113 (1968).
28. V. Jurcă, An. Șt. Univ, s l c, **XIV**, 121 (1968).
29. O. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall, J. biol. Chem., **193**, 265 (1951).
30. C. H. Fiske, Y. Subbarow, J. Biol. Chem., **66**, 375 (1925).
31. W. C. Schneider, V. R. Potter, J. Biol. Chem., **197**, 217 (1943).
32. R. Harris, J. Penniston, J. Asai, D. Green, Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., **59**, 830, (1969).
33. J. Penniston, D. Green, Arch. Biochem. Biophys., **128**, 339 (1968).

ST. CERC. BIOCHIM., 17, 1, 31—35 (1974)

PROTEINELE SERICE ŞI DIN LAPTE LA VACILE HOLSTEIN ÎN RAPORT CU TIPUL DE SISTEM NERVOS AL ACESTORA

VALENTINA JURCĂ, G. DRUGOCIU, L. RUNCEANU şi V. HRIŢCU

Rezumat. — S-a evidenţiat polimorfismul proteinelor serice şi din lapte la taurine, legat de tipologia lor nervoasă. Modelele proteinogramelor prezintă, în funcţie de tipul de sistem nervos, o serie de particularităţi care interesează eterogenitatea şi raporturile cantitative dintre fracţiuni. Se discută trăsăturile comune şi deosebirile specifice dintre electroforegramele aparţinînd diferitelor tipologii nervoase, cît şi animalelor cu acelaşi tip de sistem nervos.

În stadiul actual de dezvoltare a cunoştinţelor biologice în cercetările zootehnice, se impune ca o necesitate, găsirea unor criterii de identificare a tipului de sistem nervos. Aceasta, pe de o parte, datorită faptului că productivitatea animală depinde, în ultimă instanţă, de activitatea nervoasă superioară, iar pe de altă parte, că mecanizarea într-o cît mai mare măsură a procesului funcţional din marile ferme şi combinate zootehnice obligă organismul la o continuă restructurare fiziologică de adaptare, la cîştigarea rezistenţei la agenţi stressanţi, în general, şi patogeni nevrotici, în special.

Cercetări în acest domeniu, iniţiate la noi în ţară de G. Drugociu şi colaboratorii [1] — [9], apreciază tipul de sistem nervos al vacilor Holstein după teste complexe : alimentar-motorii, tactile, auditive şi vizuale, şi le clasifică în două mari categorii. În prima categorie sînt incluse animalele echilibrate de tip vioi şi cele echilibrate de tip lent, iar în a doua animalele dezechilibrate de tip nereţinut şi dezechilibrate de tip fricos.

Legat de problema tipului de sistem nervos la taurine, s-au efectuat, pe de o parte, cercetări referitoare la aspectul producţiei de lapte, al fecundităţii, al transmisibilităţii tipologiei nervoase [1]—[7], iar pe de altă parte, s-a urmărit efectul sfeclei furajere semizaharate asupra acestor indici [2], [6], cît şi asupra unor componenţi biochimici sanguini şi ai laptelui ca : lipide, glucide, proteine totale şi fracţii proteice prin metoda electroforezei pe hîrtie [2], [9].

Rezultatele obţinute anterior par a demonstra că, la aceste animale, procesele metabolice sînt într-o dependenţă strînsă de reactivitatea lor nervoasă.

În lucrarea de faţă, utilizînd electroforeza în gel de poliacrilamidă, procedeu cu mare putere de rezoluţie a fracţiunilor proteice, s-a căutat să se constate gradul de eterogenitate al imaginii electroforetice a proteinelor serice şi din lapte, la vacile Holstein, dependent de tipul de sistem nervos.

MATERIAL ŞI METODĂ

S-a lucrat pe un efectiv de 6 vaci Holstein sănătoase, dintr-o fermă de stat, toate de aceeaşi proveniență, în vîrstă de 6—7 ani, întreținute, furajate şi exploatate în aceleaşi condiții, toate negestante, în a doua sau a treia lună de lactație.

Animalele au fost identificate ca avînd : două, tipul de sistem nervos echilibrat vioi (V_1, V_2) ; două, tipul de sistem nervos echilibrat lent (L_1, L_2) şi două, tipul de sistem nervos dezechilibrat fricos (D_1, D_2).

Cu 1—2 ore înainte de administrarea tainurilor de amiază, s-a recoltat repetat de la fiecare animal sînge din jugulară şi probe de lapte, care au fost supuse analizei electroforetice.

Pentru separarea electroforetică a proteinelor serice şi din lapte s-a aplicat tehnica electroforezei în strat subțire, descrisă de Ahroyd [10], cu modificările aduse de Tănăsescu şi Moldoveanu [11].

La separarea proteinelor serice s-a folosit ca mediu de migrare un gel de o concentrație de 5% poliacrilamidă în tampon TRIS-EDTA-borat, la pH 7,15 [11]. Migrarea a fost efectuată la 4°C, 350 V, 25 mA, pe plăci de 13 × 8 cm, timp de 3 ore şi 30 min. Pentru fiecare probă s-a utilizat 0,04 ml ser nehemolizat.

Fracționarea proteinelor din lapte s-a realizat într-un gel cu concentrația de 7,4% poliacrilamidă în tampon TRIS-EDTA-borat, la pH 8,4. În condițiile noastre experimentale, migrarea electroforetică s-a efectuat 3 ore şi 45 min. la 4°C, pe plăci de 13 × 8 cm, aplicîndu-se o tensiune de 250 V şi o intensitate de 10 mA. Cantitatea de lapte supusă analizei a fost de 0,05 ml.

Revelarea proteinelor s-a făcut cu o soluție de amidoschwartz 0,5% în acid acetic 7%. Decolorarea s-a făcut prin spălări repetate cu acid acetic 7%.

REZULTATE ŞI DISCUȚII

Fracțiunile proteice separate din serul sanguin au fost identificate orientîndu-ne după schema dată de Clark (citat de 12) şi păstrînd denumirea convențională, anume albumine şi globuline α_1, α_2, β şi γ.

La nivelul proteinelor serului sanguin al vacilor Holstein cu sistem nervos diferit, se desprind nu numai diferențe cantitative, ci şi un anumit grad de eterogenitate a diferitelor tipuri componente.

Din imaginea electroforetică aparținînd animalelor echilibrate nervos de tip vioi (V_1, V_2, fig. 1), orientîndu-ne în sensul migrării, distingem : o fracțiune γ globulinică; un număr de 7 fracțiuni corespunzătoare fracțiunii α_2 globulinice clasice; două fracțiuni β globulinice; două fracțiuni corespunzătoare fracțiunii α_1 globulinice clasice; o fracțiune albuminică şi una prealbuminică.

În ceea ce priveşte proteinograma serului sanguin al animalelor echilibrate de tip lent, se remarcă absența fracțiunii 1 α_2 globulinice clasice (L_1, L_2, fig. 1), în rest aspectul electroforegramei în privința distribuirii fracțiunilor proteice fiind similar cu al celor echilibrate nervos, de tip vioi.

Electroforegramele aparţinînd animalelor dezechilibrate nervos de tip fricos (D_1, D_2, fig. 1), pe lîngă eterogenitatea legată de tipul de sistem nervos, manifestă şi o microeterogenitate individuală, de la animal la animal. Astfel, în serul sanguin al acestora s-a constatat lipsa fracţiunii $2\alpha_2$ globulinice clasice, iar fracţiunea β globulinică clasică prezintă variaţii nu numai cantitativ, ci şi ca număr de fracţiuni de la animal la animal; două fracţiuni la D_1 şi trei fracţiuni la D_2.

Trebuie subliniat faptul că proteinogramele serului sanguin de la animalele echilibrate nervos, de tip vioi şi de tip lent, nu prezintă diferenţe individuale în cadrul aceleiaşi tipologii nervoase.

Ca o caracteristică generală, aşa cum rezultă din cercetările noastre, trebuie remarcat că eterogenitatea proteinelor serice se manifestă, dependent de tipul de sistem nervos al animalului, la nivelul fracţiilor α_2 şi β globulinice clasice.

Această constatare capătă o semnificaţie deosebită dacă ţinem seama de faptul că numeroase observaţii [13] subliniază caracterul ereditar al tipurilor de haptoglobine, fiind din acest punct de vedere un criteriu important în selecţia zootehnică.

Modificările calitative individuale la nivelul β globulinelor, precum şi cantitatea mai redusă a γ globulinelor la animalele dezechilibrate nervos, pledează în sensul observaţiilor noastre anterioare [5] şi ale altor cercetători [14] — [16], că aceste animale prezintă o rezistenţă mai mică la îmbolnăviri şi contractează în proporţie mai mare diverse afecţiuni genitale şi mamare, comparativ cu cele echilibrate nervos. În acest context se poate menţiona că siderofilina (transferina), care este o β globulină, pe lîngă funcţia sa principală de fixare şi transportare a fierului ar juca un rol în procesele antiinflamatorii.

Examinînd electroforegramele laptelui integral (fig. 2) şi degresat (fig. 3) de la aceleaşi grupe de vaci, se constată diferenţe cantitative, în general, şi calitative, în special, la nivelul fracţiunilor cu migrare intermediară, cuprinse între fracţiunile $7'-9$.

Astfel, în laptele integral (fig. 2) al animalelor echilibrate nervos, de tip vioi (V_1, V_2), sînt prezente fracţiunile 8 şi 9, în al celor echilibrate nervos de tip lent (L_1, L_2) numai fracţiunea 8, iar în al celor dezechilibrate nervos (D_1, D_2), pe lîngă deosebirile legate de tipologia sistemului nervos, se remarcă şi diferenţe individuale la nivelul acestor fracţiuni; în cazul animalului D_2 fracţiunile intermediare $7'$, 8, 9, iar la D_1 numai fracţiunile 8 şi 9.

Diferenţele constatate la nivelul fracţiunilor proteice cu migrare intermediară din laptele integral al vacilor, în raport cu sistemul nervos al acestora, se menţin şi în cazul electroforegramelor laptelui degresat (fig. 3). Datele obţinute de noi concordă atît cu rezultatele anterioare referitoare la exteriorizarea potenţialului productiv, la frecvenţa metropatiilor şi a mastitelor, cît şi cu cele ale transmisibilităţii ereditare în legătură cu tipul de sistem nervos al vacilor de rasă Holstein.

Eterogenitatea la nivelul anumitor tipuri de proteine, dependentă de tipul de sistem nervos, sugerează că un criteriu al tipologiei nervoase la taurine l-ar putea constitui şi polimorfismul proteinelor sanguine şi ale laptelui.

Pentru confirmarea acestor constatări sînt necesare cercetări mai ample, cărora le vor fi dedicate lucrările noastre viitoare.

CONCLUZII

— Între proteinele serice ale vacilor de rasă Holstein de diferite tipuri de sistem nervos s-au pus în evidenţă deosebiri cantitative, în general, şi calitative, în special, la nivelul fracţiunilor α_2 şi β globulinice clasice.

— Proteinogramele serului sanguin de la vacile echilibrate nervos, de tip vioi şi de tip lent, nu au prezentat diferenţe individuale în cadrul aceleiaşi tipologii nervoase. Electroforegramele animalelor dezechilibrate nervos, pe lîngă variaţiile legate de tipul de sistem nervos, au prezentat deosebiri şi de la animal la animal.

Fracţiunile proteice din lapte au prezentat, în funcţie de tipul de sistem nervos al animalelor, variaţii de sens asemănător celor din serul sanguin.

Prezentat la redacţie la 12 iulie 1973

Univ. „Al. I. Cuza" Laboratorul de Biochimie şi Inst. Agronomic „Ion Ionescu de la Brad" — Catedra de Clinici. IAŞI

SERUM AND MILK PROTEINS IN COWS OF HOLSTEIN RACE RELATED TO THE NERVOUS SYSTEM TYPE

SUMMARY

Serum proteins in cows of Holstein race of different types of nervous system, presented variations at the level of classic globulin fractions. The proteins in milk presented similar variations at the level of fractions with electrophoretic intermediate migration.

BIBLIOGRAFIE

1. G. Drugociu, L. Runceanu, R. Nicorici, V. Hriţcu, S. Pascal, Lucrări Ştiinţifice, Inst. Agr. Iaşi, Zootehnie — Medicină Veterinară, **II**, 367 (1971).
2. G. Drugociu, V. Jurcă, L. Runceanu, V. Hriţcu, R. Nicorici, S. Pascal, Simp. Probleme actuale de reproducţie şi igiena animalelor domestice, Timişoara 1971, p. 115.
3. G. Drugociu, L. Runceanu, R. Nicorici, S. Pascal, V. Hriţcu, Lucrări Ştiinţifice, Inst. Agr. Iaşi, Zootehnie — Medicină Veterniară, **II**, 357 (1971).
4. G. Drugociu, O. Turliuc, L. Runceanu, R. Nicorici, S. Pascal, Lucrări Ştiinţifice, Inst. Agr. Iaşi, Zootehnie — Medicină Veterinară, **II**, 349 (1971).
5. G. Drugociu, L. Runceanu, R. Nicorici, V. Hriţcu, 21 Intern. Fachtagung für künstlliche Besamung der Rinder, 1971, Wels — Austria.

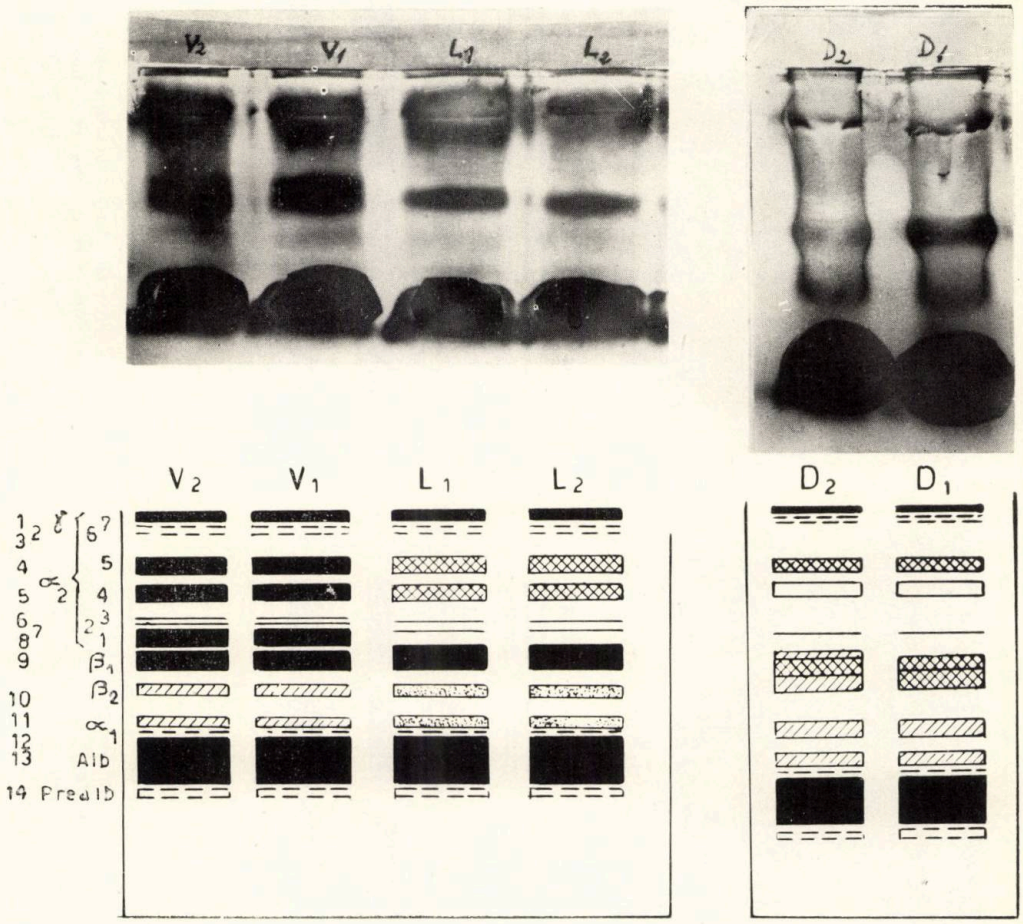


Fig. 1. — Electroforeza proteinelor serice la vacile de rasă Holstein cu diferite tipuri de sistem nervos : echilibrate vioi (V_1, V_2), echilibrate lent (L_1, L_2), dezechilibrate de tip fricos (D_1, D_2).

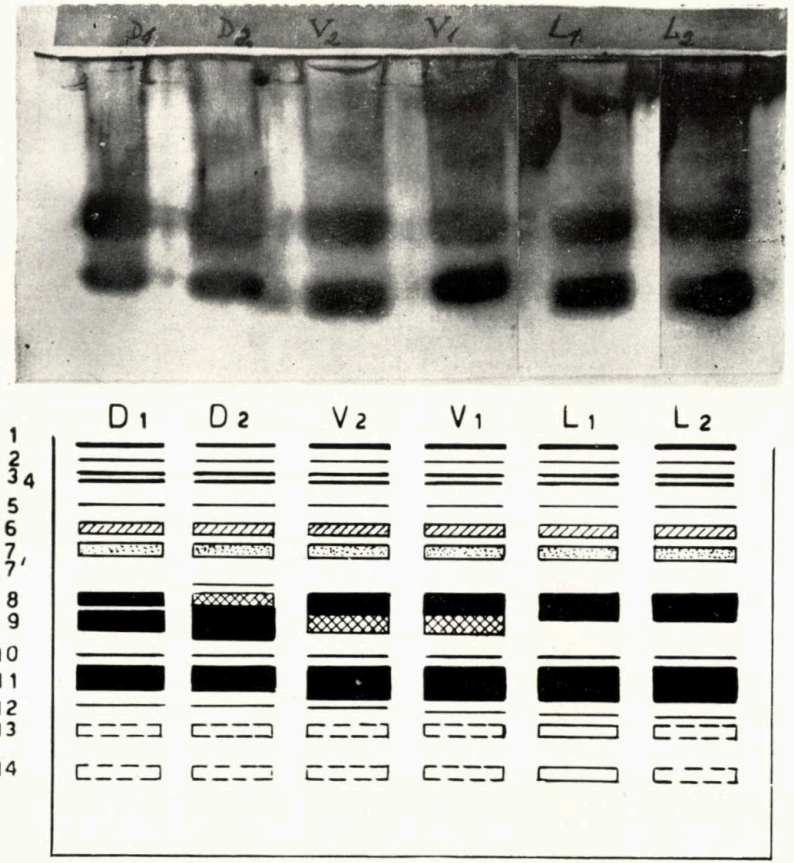


Fig. 2. — Electroforeza proteinelor din lapte integral la vacile de rasă Holstein cu diferite tipuri de sistem nervos : dezechilibrate de tip fricos (D_1, D_2), echilibrate vioi (V_2, V_1), echilibrate lent (L_1, L_2).

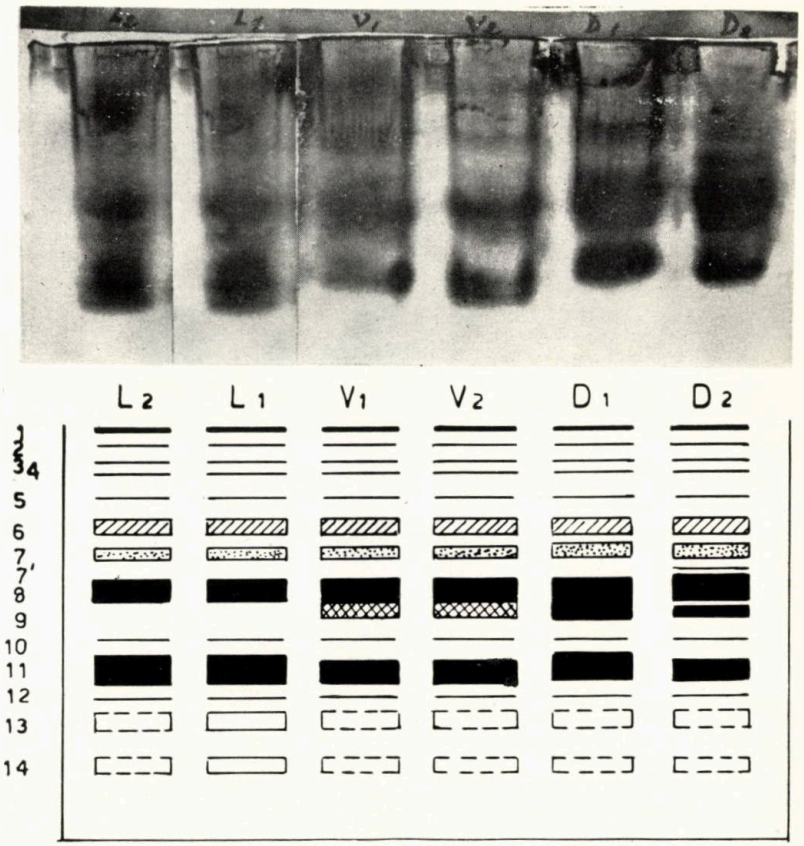


Fig. 3. — Electroforeza proteinelor din lapte degresat la vacile de rasă Holstein cu tipuri diferite de sistem nervos : echilibrate lent (L_1, L_2), echilibrate vioi (V_1, V_2), dezechilibrate de tip fricos (D_1, D_2).

6. G. Drugociu, L. Runceanu, R. Nicorici, V. Hriţcu, V. Jurcă, S. Pascal, Simp. Probleme actuale de reproducţie şi igiena animalelor domestice, Timişoara, 1971, p. 169.
7. G. Drugociu, L. Runceanu, R. Nicorici, S. Pascal, Cercetări de Medicină Veterinară, Facultatea de Med. Vet. Iaşi, nr. 1, Sesiunea Jubiliară 1971, p. 51.
8. G. Drugociu, L. Runceanu, V. Hriţcu, R. Nicorici, V. Hriţcu, S. Pascal. Lucrările Ştiinţifice, Inst. Agr. Iaşi, **II**, 1972 (sub tipar).
9. Drugociu, V. Jurca, L. Runceanu, R. Nicorici, V. Hriţcu, S. Pascal, Lucrările Ştiinţifice, Inst. Agr. Iaşi, **II**, 1972 (sub tipar).
10. L. D. Ahroyd, Analytical Biochem. 19, 399 (1967).
11. D. Tănăsescu, N. Moldoveanu, St. cerc. biochim. **11**, 313 (1968).
12. O. Macarie, D. Tănăsescu, N. Moldoveanu. St. cerc. biochim., **14**,285 (1971).
13. I. Adameşteanu, A. Nicolau, H. Birza, *Semiologia, patologia şi clinica medicală veterinară*, vol. I, Ed. Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 1966, p. 433.
14. E. P. Kokorina, Analele Rom. Sov., Agrobiologia, *3—4*, 31 (1960).
15. A. A. Kudreavţev, M. V. Klimov, Tezisi dokl. naucin. konferenţii, s. h. vuzov po fiziol. jivotnîh., 4, (1956).
16. L. B. Aizinbudas, Jurnal obşcei biologhii, **XIX**, 64, (1958).

ST. CERC. BIOCHIM., 17, 1, 37—40, (1974)

CONSIDERAŢII PRIVIND DOZAREA UREEI SANGUINE PRIN TESTUL RAPID „URASTRAT"

OLIMPIA MAMULEA şi IOANA CICOTTI

Rezumat. — Studiul comparativ de determinare a ureei sanguine prin testul rapid „Urastrat" propus de firma Gödecke şi prin metoda de referinţă propusă de noi, efectuat pe 110 probe de ser sau plasmă a arătat o corelaţie bună. Valabilitatea rezultatelor obţinute prin metoda „Urastrat" care nu necesită o aparatură specială, este la nivelul metodelor analitice cantitative clasice.

Importanţa clinică în cunoaşterea metabolismului azotat, atît în cazurile de insuficienţă renală acută, cît şi în cazurile de insuficienţă renală cronică unde hiperazotemia se instalează pe nesimţite, a condus pe diverşi cercetători la căutarea unor metode de dozare cît mai simple şi mai precise pentru evidenţierea componentelor majore : ureea şi creatinina.

Astăzi în laboratoarele clinice metodele frecvent aplicate sînt următoarele :

1. Metoda directă cu diacetil-mono-oxină descrisă de Girard şi Droux (l. Citat de Hamburger) ;

2. Metoda indirectă care foloseşte enzima urează pentru hidroliza nreei în CO_2 şi NH_3 (1. Citat de Hamburger).

Alături de diversele variante clasice ale metodei enzimatice care sînt folosite în mod obişnuit, firma Gödecke pune la dispoziţia laboratoarelor clinice un test rapid şi simplu pentru dozarea ureei sanguine.

În lucrarea de faţă s-a efectuat un studiu comparativ între testul rapid „Urstrat" [2] şi metoda enzimatică cu ureză propusă de noi în 1967 [3].

Cercetări similare folosind „Urastratul" au mai fost efectuate de von Dr. med. Egon Grabener [4] care utilizează ca metodă de referinţă tehnica propusă de Peters şi Van Slyke.

S. Bangerter, K. Rytz şi P. Cottier [5] determină azotul ureic în 320 de probe de ser sau plasmă atît prin metoda Urastrat cît şi prin metoda Gentzkow şi Mason.

Von W. Reiterer [6] foloseşte ca metodă de referinţă pentru compararea datelor furnizate de testul Urastrat metoda enzimatică Biochemica-Testkombination, Boehringer Mannheim.

În toate lucrările citate se constată o bună corelaţie între metode folosite de autor şi acest test simplificat.

Material şi metodă. Pentru verificarea testului „Urastrat" am efectuat un studiu pe 110 seruri provenite de la bolnavii internaţi în Clinica noastră. Dintre acestea 77 de seruri au avut valori pînă la 100 mg.% uree, iar restul de 33 valori cuprinse între 101—480 mg.%. Valorile ridicate proveneau de la bolnavii internaţi în serviciul de hemodializă fapt care ne-a permis executarea dozărilor de uree prin ambele metode şi în timpul procesului de epurare extra-renală.

În cazurile unor valori de uree de peste 140 mg.% a fost necesară efectuarea unor diluţii cu un ser test a cărui concentraţie în uree a fost determinată de noi în prealabil.

Diluţiile s-au efectuat în modul următor:

Pentru valori ale ureei cuprinse între 140—220 mg.% 1 : 1
„ „ „ „ „ 221—330 mg.% 1 : 2
„ „ „ „ „ 301—450 mg.% 1 : 3
„ „ „ „ „ 451—600 mg.% 1 : 4

Am ales pentru acest studiu comparativ metoda enzimatică propusă de noi (3) deoarece foloseşte aceiaşi cantitate de ser 0,2 ml., acelaşi tampon fosfat şi acelaşi timp de reacţie la temperatura camerei ca şi metoda „Urastrat". În metoda noastră de referinţă cantitatea de amoniac rezultat din reacţie este determinat cu ajutorul reactivului Nessler, preparat prin procedeul lui Peters şi Van Slyke. În cazul „Urastratului" este utilizat principiul difuziunii. Reactivii necesari dozărilor de uree sînt impregnaţi pe o bandă în diverse zone (fig. 1). În eprubetele calibrate ale trusei se introduce banda „Urastrat" peste cantitatea de ser necesară reacţiei fixîndu-se la perfectă verticalitate cu ajutorul unei cleme. Pe baza efectului de capilaritate se urcă în banda „Urastrat" pînă în zona unde se găseşte impregnată ureaza. Aici ureea este descompusă în CO_2 care se degaje şi NH_3 care se combină cu tamponul de fosfat producînd fosfatul de amoniu. Prin migrarea ascendentă a acestuia în zona de carbonat de potasiu, fosfatul de amoniu eliberează amoniacul în forma gazoasă care difuzează prin bara de crilon plastic în zona de indicator (bara de crilon plastic are rolul de barieră în ascensiunea serului). În zona de indicator amoniacul combinîndu-se cu acidul tartric formează tartartul de amoniu, valoarea pH-ului se schimbă, indicatorul virează în albastru. Înălţimea zonei în care s-a produs virajul este proporţională cu concentraţia de amoniac. După exact 30 minute banda test este scoasă din eprubetă şi cu un creion bine ascuţit se marchează meniscul inferior al zonei colorate în albastru. Evaluarea rezultatelor se face fie cu şablonul anexat în trusă, fie după formula indicată de casa producătoare în funcţie de înălţimea porţiunii colorate în albastru.

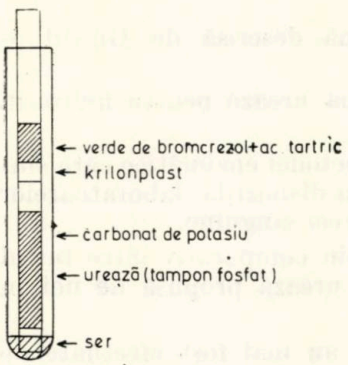


Fig. 1. — Bandă Urastrat

Rezultate şi discuţii. Valorile de uree obţinute de noi prin cele două metode, au fost înregistrate pe un grafic de dispersie (fig. 2).

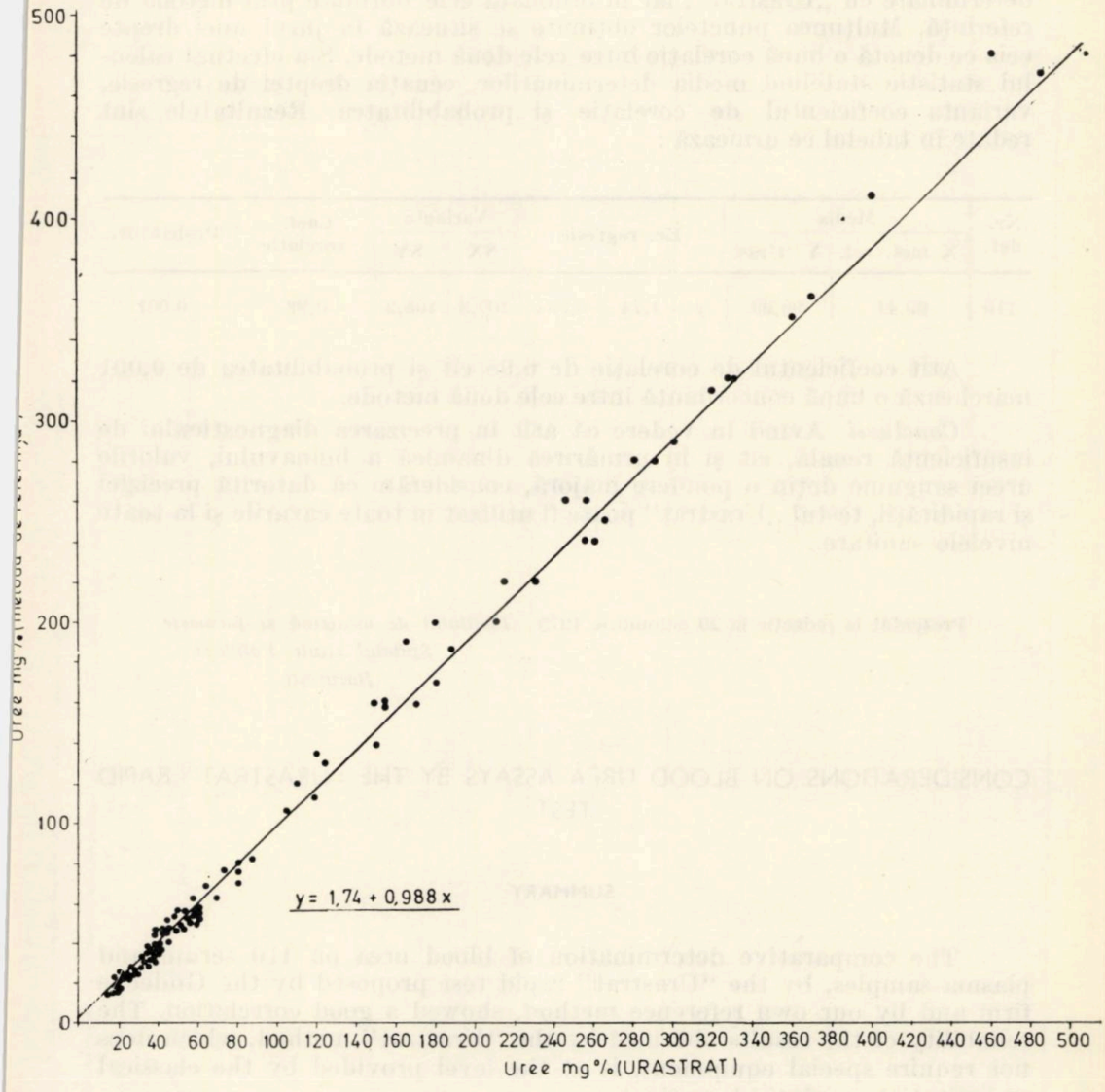


Fig. 2. — Grafic de dispersie între metoda Urastrat şi metoda propusă de noi.

În abscisă au fost trecute cantităţile de uree exprimate în mg. % determinate cu „Urastrat", iar în ordonată cele obţinute prin metoda de referinţă. Mulţimea punctelor obţinute se situează în jurul unei drepte ceia ce denotă o bună corelaţie între cele două metode. S-a efectuat calculul statistic stabilind media determinărilor, ecuaţia dreptei de regresie, varianta coeficientul de corelaţie şi probabilitatea. Rezultatele sînt redate în tabelul ce urmează :

Nr. det.	Media		Ec. regresie	Varianta		Coef. corelaţie	Probabilit.
	X met. ref.	Y "Uras.		SX	SY		
110	99,44	99,99	y = 1,74 + 0,98x	107,3	108,2	0,98	0,001

Atît coeficientul de corelaţie de 0,98 cît şi probabilitatea de 0,001 marchează o bună concordanţă între cele două metode.

Concluzii. Avînd în vedere că atît în precizarea diagnosticului de insuficienţă renală, cît şi în urmărirea dinamică a bolnavului, valorile ureei sanguine deţin o pondere majoră, considerăm că datorită preciziei şi rapidităţii, testul „Urastrat" poate fi utilizat în toate cazurile şi la toate nivelele sanitare.

Prezentat la redacţie la 20 octombrie 1973

Institutul de medicină şi farmacie
Spitalul clinic Panduri
Bucureşti

CONSIDERATIONS ON BLOOD UREA ASSAYS BY THE "URASTRAT" RAPID TEST

SUMMARY

The comparative determination of blood urea on 110 serum and plasma samples, by the "Urastrat" rapid test proposed by the Gödecke firm and by our own reference method, showed a good correlation. The reliability of the results obtained by the "Urastrat" method, which does not require special equipment, is at the level provided by the classical quantitative analytical methods.

BIBLIOGRAFIA

1. J. Hamburger, *Neurologie*, Flamarion, Paris, 1966.
2. * * * Urastrat, Gödecke (prospect).
3. O. Mamulea, F. Tocilescu, St. cerc. biochim., **10**, 267 (1967).
4. E. Grabener, Münch. med. Wschr., **105**, 1604 (1963).
5. S. Bangerter, R. Rytz, P. Cottier, Schweiz. med. Wschr., **99**, 110 (1969).
6. W. Reiterer, Wiener med. Wschr., **121**, 453 (1971).

ST. CERC. BIOCHIM., 17, 1, 41—46 (1974)

CERCETĂRI CHEMOTAXONOMICE LA PLANTELE SUPERIOARE. VII. PIGMENȚII CAROTENOIDICI DIN UNELE SPECII ALE GENULUI *AESCULUS*

GAVRIL NEAMȚU și CORNEL BODEA

Rezumat. — S-au cercetat pigmenții carotenoidici din frunzele și polenul de *Aesculus carnea*, *A. hemiacanta*, *A. hybrida*, *A. octandra*, *A. parviflora*, *A. pavia* și *A. turbinata*.

În frunze apare ca un aspect caracteristic prezența α-carotinei, în cantitate relativ mare.

În polen s-au identificat un număr mare de carotenoide, în special ceto-hidroxicarotenoide care au în moleculă inele cu structură pentaciclică. Pigmentul principal este capsantina, alături de care s-au identificat capsorubina, β-carotina, luteina, zeaxantina, capsantinmonoepoxidul și alte carotenoide care au în moleculă inele pentaciclice și hexaciclice.

Importanță chemotaxonomică pentru genul *Aesculus* prezintă ceto-hidroxicarotenoidele de tipul capsantinei, care au în moleculă inele cu structură pentaciclică.

În cadrul cercetărilor chemotaxonomice la plantele superioare ne-am ocupat, în continuare, de studiul pigmenților carotenoidici din unele specii ale genului *Aesculus*, specii care nu au fost cercetate pînă în prezent sub acest aspect și care prezintă o carotenogeneză bogată la nivelul polenului.

Datorită cercetărilor chemotaxonomice din ultimii ani, efectuate în numeroase țări, s-a reușit să se determine unii pigmenți carotenoidici specifici și caracteristici pentru diferite grupe de plante inferioare (ciuperci, bacterii, alge etc.) (1—6) și pentru plantele superioare heterotrofe (7—10). La plantele superioare autotrofe asemenea cercetări sînt mai dificile, deoarece există specii care aparțin aceluiași gen și conțin pigmenți carotenoidici cu totul diferiți. Așa sînt, de exemplu, speciile genurilor *Piracanta*, *Mimulus*, *Astragalus* etc. (1—3, 11). Există însă și la plantele superioare autotrofe specii — și chiar genuri — de plante care conțin carotenoide specifice și caracteristice pentru întreaga unitate taxonomică. Astfel, în florile de *Eschscholtzia californica* se găsește ca pigment principal și caracteristic eschscholtxantina (1,3), iar în florile de *Adonis aestivalis* se găsește, tot ca pigment principal și caracteristic, astaxantina (3). În toate speciile genului *Rosa* se află în fructele coapte, ca pigment caracteristic, rubixantina (1—3), iar în fructele de tomate se găsește licopina (1—3).

În fructele de *Taxus baccata* se găsește ca pigment caracteristic rodoxantina, care reprezintă singura dicetonă naturală cunoscută pînă în prezent, cu sistem polienic retro (1—3).

Din cercetarea pigmenților carotenoidici la *Aesculus hippocastanum* (12) și *A. rubicunda* (13) s-a constatat că ambele specii, deși au un colorit floral diferit, conțin în polen un mare număr de ceto-hidroxi-carotenoide cu structură pentaciclică, de tipul capsantinei, care se găsesc destul de rar în natură.

În lucrarea de față se prezintă pigmenții carotenoidici din frunzele și polenul de *Aesculus carnea*, *A. hemiacanta*, *A. hybrida*, *A. octandra*, *A. parviflora*, *A. pavia* și *A. turbinata*, specii care pînă în prezent nu au fost cercetate sub aspectul pigmenților carotenoidici. Cu toate că speciile menționate au un colorit floral diferit, ele au polenul de culoare portocalie-roșietică, caracteristică ceto-carotenoidelor, fapt ce ne-a determinat să cercetăm pigmenții carotenoidici și din polenul acestor specii.

MATERIAL ȘI METODE

Plantele cercetate, cu indicarea perioadei de înflorire și a locului de recoltare, sînt trecute în tabela 1.

Tabela 1

Plante cercetate din genul *Aesculus*	Perioada de înflorire	Locul de recoltare
A. carnea Hayne	IV—VI	Grădina botanică Cluj Municipiul Turda, Jud. Cluj
A. hemiacanta Țopa	V—VII	Municipiul Cluj Municipiul Dej, Jud. Cluj Oraș Gherla, Jud. Cluj
A. hybrida D.C.	V—VI	Municipiul Cluj Municipiul Turda, Jud. Cluj Municipiul Oradea, Jud. Bihor
A. octandra Marsh	V—VII	Municipiul Cluj Com. Gilău, Jud. Cluj Posada, Jud. Ploești
A. parviflora Walt	VII—VIII	Grădina Botanică Cluj
A. pavia L.	V—VI	Grădina botanică Cluj Municipiul Cluj Municipiul Turda, Jud. Cluj
A. turbinata Bl.	V—VI	Grădina botanică Cluj Com. Prundul Bârgăului, Jud. Bistrița-Năsăud Vatra Dornei, Jud. Suceava

Pentru determinarea pigmenţilor carotenoidici s-a folosit material proaspăt şi conservat (frunze, flori şi polen), recoltat în anii 1970—1973. Conservarea materialului vegetal, în special a polenului, s-a făcut în eter de petrol, în vase ermetic închise.

Extragerea pigmenţilor carotenoidici s-a făcut cu un amestec de eter de petrol-acetonă-metanol (6 : 3 : 1). Pentru separarea şi purificarea carotenoidelor s-a folosit în cea mai mare parte cromatografia pe coloană, utilizînd ca adsorbant carbonatul de calciu şi un amestec de oxid de magneziu cu nisip foarte fin. Coloanele adsorbante s-au developat cu un amestec de eter de petrol-benzen-acetonă, în raport de 5 : 3 : 2. Pentru verificarea purităţii pigmenţilor şi pentru cromatograme de amestec s-a folosit şi cromatografia în strat subţire, utilizînd ca adsorbant oxid de magneziu şi silicagel, iar ca developant amestec de etanol-cloroform-eter de petrol 2 : 2 : 6.

Cromatogramele de amestec s-au făcut cu carotenoide naturale extrase din *Capsicum annuum* (fructe roşii şi boia) şi din polen de *Aesculus hippocastanum şi A. rubicunda* (12—13).

Saponificarea pigmenţilor din polen s-a făcut cu soluţie etanolică de hidroxid de potasiu 10 %, timp de 45 de minute, la 40°C.

Identificarea şi determinarea pigmenţilor carotenoidici s-au făcut prin aceleaşi metode ca şi în lucrările anterioare (12—13).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Conţinutul pigmenţilor carotenoidici din frunze mature se prezintă în tabela 2.

Tabela 2

Conţinutul de carotenoide foliare din *Aesculus carnea, A. hemiacanta, A. hybrida, A. octandra, A. parviflora, A. pavia şi A. turbinata* în mg/100 g frunze proaspete

Pigmenţi carotinoidici	*Aesculus carnea*	*Aesculus hemi-acanta*	*Aesculus hybrida*	*Aesculus octandra*	*Aesculus parviflora*	*Aesculus pavia*	*Aesculus turbinata*
a. *Cu structură α-iononică*							
α-Carotina	0,69	0,63	0,72	0,62	0,70	0,67	0,70
Luteina	2,12	1,94	2,06	2,10	2,03	2,16	2,00
b. *Cu structură β-iononică*							
β-Carotina	1,78	1,65	1,82	1,86	1,75	1,97	2,08
Criptoxantina	0,34	0,31	0,37	0,35	0,38	0,32	0,30
Violaxantina	0,47	0,40	0,44	0,46	0,50	0,43	0,38
Neoxantina	0,12	0,08	0,10	0,09	0,13	0,16	0,10
Pigmenţi chinonici	2,80	2,76	2,69	2,67	2,85	2,50	2,74

Din cercetările efectuate reiese că între pigmenții carotenoidici foliari (din speciile menționate) nu există deosebiri calitative, ci numai cantitative, ce nu au o semnificație deosebită.

În frunzele plantelor cercetate se găsesc carotenoide comune, frecvent întîlnite în țesuturile verzi. Pigmenții principali sînt luteina și β-carotina. Ca un aspect caracteristic apare prezența α-carotinei în cantitate relativ mare (față de conținutul acestui pigment în frunzele altor specii autotrofe), astfel că frunzele speciilor de *Aesculus* pot constitui surse însemnate pentru extragerea acestui pigment. În cantitate relativ mică, față de celelalte carotenoide foliare, se află neoxantina.

Pe lîngă carotenoidele identificate în frunze se găsesc și pigmenți chinonici de culoare galbenă, foarte puternic reținuți pe coloana adsorbantă.

Prin cromatografia în strat subțire s-au determinat pigmenții carotenoidici și din elementele florale, separat din sepale, petale, filamente staminale și pistil.

În sepale s-au identificat aceleași carotenoide ca și în frunze. Cantitatea de criptoxantină și violaxantină, apreciată după lățimea zonei, este mai mare decît în frunze, în timp ce conținutul α-carotinei și β-carotinei este mai mic. În petale, indiferent de coloritul lor, s-au identificat β-carotina, luteina, violaxantina, pigmenți chinonici și antociani.

În filamentele staminelor și în pistil s-au identificat β-carotina, luteina, pigmenți chinonici și principalele carotenoide din polen, dar în cantitate foarte mică.

Partea cea mai bogată în carotenoide la speciile de *Aesculus* o constituie polenul. Conținutul pigmenților carotenoidici din polenul speciilor cercetate se prezintă în tabela 3.

Ca un aspect caracteristic, cu importanță chemotaxonomică pentru speciile genului *Aesculus*, este predominarea în polen a carotenoidelor care au în moleculă inele cu structură pentaciclică, față de acelea ale căror inele iononice au structură hexaciclică. Dintre carotenoidele cu inele pentaciclice, care se găsesc în toate speciile cercetate, menționăm capsantina, capsorubina și capsantinmonoepoxidul. Alături de aceste carotenoide, în cantitate mai mică s-au identificat în unele specii și alte carotenoide cu structură pentaciclică, rar întîlnite în natură, cum sînt criptocapsina, criptocapsona, capsantona și cabsorubona. Dintre carotenoidele cu structură α-iononică s-a identificat numai luteina, care se găsește în cantitate mai mică decît în frunze. Dintre cele cu structură β-iononică s-au identificat, în toate speciile, β-carotina și zeaxantina, iar în unele specii și criptoxantina.

Pigmentul principal este în toate speciile, capsantina.

În polen s-au pus în evidență și unele ceto-hidroxi-carotenoide necunoscute, de culoare roșie-violacee, probabil cu structură pentaciclică, care din cauza cantității lor reduse, nu s-au putut determina pînă în prezent.

Între pigmenții carotenoidici din polenul speciilor cercetate există diferențieri atît calitative cît și cantitative. Specia cea mai bogată în carotenoide este *A. pavia*.

Un conținut ridicat de carotenoide au și speciile hibride *A. carnea* (*A. pavia* × *A. hippocastanum*) și *A. hybrida* (*A. pavia* × *A. octandra*) care provin din *A. pavia* prin încrucișare cu *A. hippocastanum* și respectiv *A. octandra* (14).

Tabela 3

Conținutul carotenoidelor din polenul de *Aesculus carnea*, *A. hemiacanta*, *A. hybrida*, *A. octandra*, *A. parviflora*, *A. pavia*, *A. turbinata*, în mg/100 g polen proaspăt

Carotenoide	*Aesculus carnea*	*Aesculus hemiacanta*	*Aesculus hybrida*	*Aesculus octandra*	*Aesculus parviflora*	*Aesculus pavia*	*Aesculus turbinata*
a. *Cu structură α-iononică*							
Luteina	0,48	0,54	0,37	0,65	0,47	0,52	0,58
b. *Cu structură β-iononică*							
β-Carotina	1,46	1,32	1,56	1,64	1,42	1,64	1,53
Criptoxantina	0,08	—	0,14	—	—	0,25	0,10
Zeaxantina	0,34	0,26	0,37	0,22	0,18	0,43	0,21
c. *Cu structură pentaciclică*							
Criptocapsina	0,17	—	0,12	—	0,21	0,26	—
Criptocapsona	0,10	—	0,10	—	0,18	0,30	—
Capsantina	3,36	2,86	3,49	3,06	2,85	3,64	3,19
Capsantinmonoepoxid	0,30	0,18	0,32	0,34	0,27	0,42	0,26
Capsantonă	0,22	—	0,27	urme	—	0,74	0,08
Capsorubină	1,10	0,84	1,16	0,78	0,53	1,25	0,88
Capsorubonă	0,16	urme	0,06	—	0,12	0,18	0,14

Deosebirile care apar în conținutul pigmenților carotenoidici la speciile cercetate se datoresc, probabil, metabolismului lor specific și influenței diferite a factorilor de mediu.

În polenul speciilor de *Aesculus* se găsesc în general un număr mai mare de ceto-hidroxi-carotenoide cu structură pentaciclică decît în polenul altor plante (15—17). Speciile acestui gen constituie o sursă importantă pentru obținerea ceto-hidroxi-carotenoidelor care au în moleculă inele cu structură pentaciclică.

CONCLUZII

Speciile cercetate din genul *Aesculus* se caracterizează printr-un conținut mare de carotenoide în polen. Sub aspect cantitativ predomină carotenoidele de tipul capsantinei, care au în moleculă inele cu 5 atomi de carbon și care prezintă importanță chemotaxonomică. Pigmentul principal este capsantina, alături de care s-au identificat și alte carotenoide care au în moleculă inele pentaciclice și hexaciclice.

În frunze se găsește în cantitate relativ mare α-carotina, astfel că frunzele speciilor de *Aesculus* constituie surse însemnate pentru obținerea acestui pigment.

Pigmenții carotenoidici din frunze și flori sînt însoțiți de pigmenți chinonici.

Prezentat la redacție la 18 iulie 1973

Institutul agronomic
„Dr. Petru Groza" Cluj
Catedra de biochimie

CHEMOTAXONOMIC INVESTIGATIONS ON HIGHER PLANTS. VII. CAROTENOID PIGMENTS IN SOME SPECIES OF *AESCULUS* GENUS

SUMMARY

The carotenoid pigments were studied in the leaves and pollen of *Aesculus carnea*, *A. hemiacanta*, *A. hybrida*, *A. octandra*, *A. parviflora*, *A. pavia* and *A. turbinata*.

A significant aspect was the presence of high amounts of α-carotene in the leaves.

Numerous carotenoids, especially keto-hydroxy-carotenoids, having pentanuclear rings in their molecule, were identified in the pollen. The principal pigment was capsanthin and there were also found : capsorubin, β-carotene, lutein, zeaxanthin, capsanthinmonoepoxide and various other carotenoids having pentacyclic and hexacyclic rings in their molecule.

For *Aesculus* genus, the keto-hydroxy-carotenoids of capsanthin type have a special chemotaxonomic significance as they exhibit a pentacyclic structure.

BIBLIOGRAFIE

1. T. W. Goodwin, *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, Acad. Press, London and New York, 1965, pag. 127.
2. T. W. Goodwin, *The carotenoids*, citat din *Comparative Phytochemistry* (T. Swain), Acad. Press, London and New York, 1966, pag. 121.
3. O. Isler, *Carotenoids*, Birkhäuser Verlag, Basel und Stuttgart, 1971, pag. 29, 61, 574.
4. T. W. Goodwin, D. M. Thomas, Phytochemistry, **3**, 47 (1964).
5. T. O. M. Nakayama, In *Physiology and Biochemistry of the Algae* (J. Myers), Acad. Press, London and New York, 1963.
6. O. B. Weeks, A. G. Andrews, B. O. Brown, B. C. L. Weedon, Nature, **244**, 879 (1969).
7. G. Neamțu, C. Bodea, Rev. roum. Biochim., **6**, 227 (1969).
8. G. Neamțu, C. Bodea, St. cerc. biochim., **13**, 405 (1970).
9. G. Neamțu, C. Bodea, Rev. roum. Biochim., **8**, 129 (1971).
10. G. Neamțu, C. Bodea, St. cerc. biochim., **15**, 181 (1972).
11. G. Neamțu, C. Bodea, Rev. roum. Biochim., **6**, 157 (1969).
12 G. Neamțu, C. Bodea, St. cerc. biochim., **12**, 77 (1969).
13. G. Neamțu, C. Bodea, St. cerc. biochim., **16**, 35 (1973).
14. I. Dumitriu-Tătăranu, *Arbori și arbuști forestieri și ornamentali cultivați în R.S.R.*, Edit. agro-silvică, București, 1960, pag. 182.
15. P. Karrer, A. Oswald, Helv. Chim. Acta, **18**, 1303 (1935).
16. P. Karrer, E. Leumann, Helv. Chim. Acta, **34**, 1412 (1951).
17. A. Sykut, Bull. Acad. Polon. Sci. Ser., **XIII**, 5 (1965).

ST. CERC. BIOCHIM., 17, 1, 47–57, (1974)

PERTURBAREA METABOLISMULUI GLUCIDIC ÎN BOALA DE IRADIERE

RADU OLINESCU *

Rezumat. — Dintre numeroasele modificări ale metabolismului glucidic observate în urma iradierii experimentale sau terapeutice sînt confirmate acumularea glicogenului şi a glucozei în ţesuturi. Pe baza datelor experimentale proprii, cît şi ale altor autori sînt menţionate principalele perturbări ale concentraţiilor glicogenului şi glucozei, ale raportului lactat/piruvat, cît şi a unor enzime implicate în glicoliză cum este lactatdehidrogenaza, în urma iradierii experimentale.

Modificările observate la nivelul glicogenului sau al unor enzime din glicoliză în urma iradierii, ar putea fi explicate prin alterarea reglării activităţii enzimatice de către adenin nucleotizii ATP, NAD^+, $NADP^+$. De asemenea sînt discutate modificările induse de iradiere în metabolismul adenin nucleotizilor.

În ciuda unor foarte numeroase lucrări, boala de iradiere rămîne în continuare una din problemele neelucidate ale patologiei biochimice. Paralel cu studiile microscopice privitor la aspectul morfologic, s-a acumulat în timp un vast material descriptiv asupra variaţiei unor parametri biochimici în cursul bolii de iradiere, obţinîndu-se însă foarte puţine concluzii mai ales de ordin practic. Majoritatea studiilor întreprinse cuprind observarea variaţiilor cantitative al unui singur parametru biochimic-enzimă sau metabolit – de multe ori aceste modificări fiind efecte secundare. Complexitatea acţiunii radiaţiilor ionizante asupra organismelor face foarte dificilă interpretarea modificărilor biochimice observate, cu atît mai mult cu cît s-au semnalat mari variaţii în funcţie de specie, organ sau individ.

Deci, în ciuda vastului material descriptiv acumulat, recent se tinde la părăsirea acestei direcţii de cercetare biochimică în boala de iradiere, noua linie axîndu-se pe studierea modificărilor calitative, a reglării proceselor metabolice, în speranţa găsirii unei leziuni primare ce va induce ulterior modificări reversibile sau ireversibile. Această direcţie de cercetare pare o continuare a vechii ipoteze a ţintei", reactualizată pe baza noilor cunoştinţe din domeniul reglării proceselor enzimatice, al controlului alosteric sau inductiv al reacţiilor biochimice.

Metabolismul glucidic, unul din cele mai bine studiate din punct de vedere al reglării activităţii enzimatice, a fost amplu investigat în boala de iradiere, dar mai ales fragmentat, la nivelul unei enzime sau al unui

*) Asistenţa tehnică : Letiţia Costea şi Despina Bejan

metabolit. Datorită implicaţiilor sale energetice, structurale şi metabolice, studierea modificărilor componenţilor acestui metabolism în boala de iradiere oferă posibilitatea obţinerii unor concluzii dacă nu practice cel puţin orientativ-teoretice.

În scopul obţinerii unei concepţii interpretative unitare s-au studiat modificările induse de iradiere la nivelul unor componenţi importanţi ai metabolismului glucidic cum sînt glicogenul, glucoza, raportul lactat/piruvat.

MATERIAL ŞI METODE

Rezultatele experimentale au fost obţinute pe şobolani Wistar (120—140 g, masculi) şi pe porci rasă York, (60 ± 5 kg, femele negestante). Iradierile s-au făcut în toate cazurile cu raze gamma provenite de la un Cobaltron, Chisobalt 75 (Praga), 3000 Ci, debit 33 R/minut, distanţă 165 cm.

Determinările parametrilor biochimici s-au făcut înainte şi la diferite perioade de timp după iradiere menţionate în grafice. În cazul şobolanilor s-a constituit un lot martor, neiradiat, ţinut în aceleaşi condiţii ca loturile iradiate, conţinînd minimum 20 animale. În cazul porcilor, fiecare animal a constituit propriul său martor.

Pentru măsurarea activităţii enzimatice sau a concentraţiei unor metaboliţi s-au folosit următoarele metode: Valentine şi colaboratorii pentru determinarea glicogenului hepatic (1), Ceriotti şi Frank pentru glucoză (2), Merck-1-Test, Art. Nr. 3349 pentru lacticodehidrogenază, Chagnon şi colaboratorii pentru determinarea acidului lactic (3), Friedeman şi Hagen pentru acidul piruvic (4), Beutler şi col. pentru glutationul redus (5).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Primul component studiat al metabolismului glucidic este glicogenul. Acest compus constituie forma de depozitare a glucidelor, concentraţia lui din ficat sau alte organe fiind rezultanta echilibrului dinamic dintre glicogenoliză şi glicogenogeneză. În boala de iradiere glicogenul, ca rezervă potenţială de energie a fost amplu cercetat mai ales în ficat.

În figura 1 sînt prezentate modificările concentraţiei glicogenului hepatic la şobolani după iradiere cu o doză letală de 700 razi. La fel ca şi în cazul altei specii, şoareci, se observă un răspuns bifazic, caracterizat printr-o creştere a glicogenului hepatic după prima zi de la iradiere, după care urmează o scădere către valorile iniţiale. În cazul şoarecilor (6) această creştere a glicogenului după prima zi de la iradiere este mult mai evidentă. După şapte zile, în general se observă o nouă creştere continuă a glicogenului hepatic cu maxim după 12 zile. Aceste rezultate au fost confirmate şi de alţi autori (7, 8) folosind alte metode de determinare a glicogenului, pe alte specii de animale şi în alte organe. Creşterea glicogenului hepatic nu pare să fie dependentă de doza de iradiere folosită. În interpretarea

acestei acumulări de glicogen trebuie să se țină seama și de faptul că inaniția sau pierderea apetitului, consecutiv iradierii, antrenează un răspuns asemănător. Acumularea glicogenului hepatic este abolită de hipofizectomie (9).

Creșterea glicogenului a mai fost observată și în creierul mai multor specii de animale și interpretată ca datorită unei creșteri a aportului de

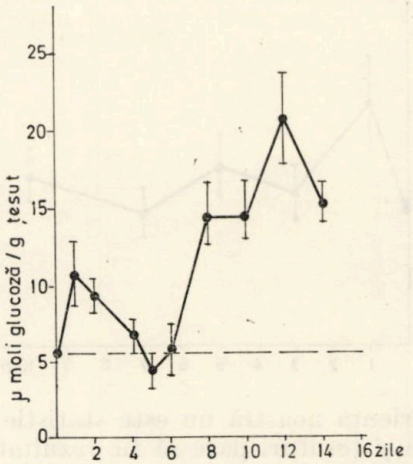


Fig. 1. — Conținutul în glicogen hepatic la șobolani în urma iradierii cu 700 razi. ——— variația glicogenului în timp, -- -- -- valorile inițiale.

glucoză, sistemele enzimatice implicate în scindarea glicogenului nefiind afectate în urma iradierii (10). După părerea acestor autori acumularea glicogenului s-ar datora creșterii aportului de glucoză.

Mecanismul creșterii glicogenului în majoritatea țesuturilor în urma iradierii nu este cunoscut. Se știe că, normal un aflux crescut de glucoză produce o creștere a conținutului în glicogen, iar în cazul bolii de iradiere acest fapt este evident. Modificările observate, mai ales a doua creștere, sugerează o perturbare în scindarea glicogenului. Nici creșterea catecolaminelor, ca răspuns nespecific la stress, și nici acumularea glicogenului nu activează așa cum ar fi fost de așteptat, sistemul fosforilazic catabolizant. Acest sistem este puternic influențat de variații în concentrația adenin nucleotizilor și a fosfatului anorganic, care de asemenea au fost observate în cursul bolii de iradiere. Ținînd seama de datele existente (7—10) s-ar părea că acumularea glicogenului se produce în contextul unei glicogeneze normale, cu un aport mare în glucoză și cu o glicogenoliză modificată, incapabilă să refacă balanța glicogenului.

Glucoza din sînge sau țesuturi, constitue al doilea component studiat din metabolismul glucidic.

În figura 2, ca și în tabelul I prezentăm rezultatele obținute în urma iradierii experimentale pe porci și șobolani. În cazul porcilor s-a folosit o doză de 340 razi, depășind DL 50/30 zile, iar la șobolani s-a cercetat și efectul variației dozei. În cazul ambelor specii se constată o creștere a glicemiei, mai evidentă la șobolani, unde se mai observă și o creștere continuă cu doza. Atît din figura 2 cît și din tabelul I se constată apariția unor valori semnificative doar pentru doze letale. Rezultatele noastre, cît

şi cele din literatură (11, 12) arată persistenţa hiperglicemiei doar pentru primele 2—3 zile după o iradiere depăşind DL 50/30 zile.

Creşterea glicemiei trebuie corelată şi cu o creştere în general a glucozei observată în diferite ţesuturi, mai ales în ficat şi creier. Kay şi Enteman (11) au observat o hiperglicemie pasageră şi în cazul bolnavilor iradiaţi terapeutic. Această creştere nu a fost confirmată de alţi autori şi, după

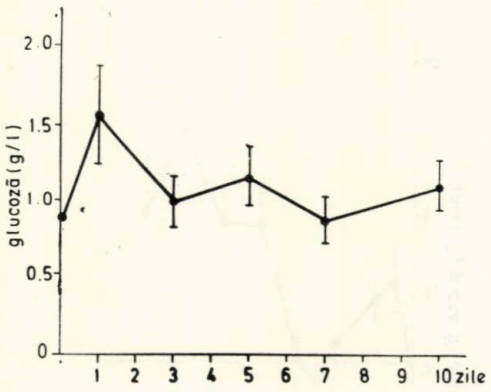


Fig. 2. — Variaţia în timp a glicemiei la porci după iradierea cu 340 razi.

experienţa noastră nu este statistic semnificativă. Creşterea glucozei din sînge şi ţesuturi pare să fie rezultatul stressului provocat de iradiere, de deoarece în perioada precoce a bolii s-au observat creşteri ale hormonilor corticosteroizi, catecolaminele şi ACTH, modificări asemănătoare şi altor forme de stress.

Acumularea glucozei în sînge şi ţesuturi, fapt confirmat de majoritatea cercetătorilor nu poate fi explicată în totalitate prin creşterea hormonilor hiperglicemianţi. Parţial, poate fi implicată şi o inhibare a glicolizei. Interesant de menţionat este creşterea în ţesuturi şi în sînge a unor compuşi legaţi structural de glucoză, cum sînt mucopolizaharidele (12) şi deoxiriboză (13). În aceste cazuri creşterile par să fie datorate unor modificări morfologice, distrugerii tisulare mărite în urma iradierii. Deoxiriboza, rezultată probabil din degradarea acidului deoxiribonucleic, creşte în sîngele şi urina şobolanilor, după experienţa noastră, numai pentru doze mari, depăşind DL 50/30 zile.

Glicoliza constitue unul din cele mai importante procese ale metabolismului glucidic. În boala de iradiere glicoliza a fost mult cercetată, dar, cu toate numeroasele lucrări, nu există o concepţie unitară nici asupra modificării ei şi nici asupra unui eventual mecanism. S-a observat în general o tendinţă de scădere a glicolizei la animalele iradiate, nu prea accentuată şi mai evidentă în cazul unor doze mari ce depăşesc DL 50/30. Scăderea glicolizei variază mult în funcţie de specie şi de organ, cea mai accentuată observîndu-se în măduva osoasă (14) şi cea mai mică în ficat (15). Experienţe efectuate pe felii de ţesuturi au arătat fie scăderea (16), fie creşterea (17) transformării glucozei marcate cu C^{14} în CO_2 în prima zi după iradiere. Cu toate controversele existente, majoritatea lucrărilor par să fie de acord cel puţin că modificările glicolizei au loc primele 2—12 ore de la iradiere (18), observîndu-se şi la om după iradiere terapeutică o scădere a glicolizei în hematii (19).

Experienţe efectuate pe hematii iradiate „in vitro" au arătat o activare a glicolizei pînă la 60 KR, după care la doze mai mari se produce o inhibare. Prin incubarea suspensiei de hematii iradiate la 37°C s-a constatat normalizarea glicolizei şi a permeabilităţii membranei eritrocitare (20, 21), revenirea la valorile iniţiale.

Studiul variaţiilor cantitative ale intermediarilor din glicoliza anaerobă, nu a permis obţinerea unor concluzii clare. Din lucrările tratînd acest studiu se observă că modificările intermediarilor glicolitici sînt mai numeroase la nivelul glucozo-6-fosfatului (6, 22) şi fructozo-1,6-difosfatului pe de o parte şi al acizilor lactic şi piruvic pe de altă parte (6, 22). Studiul unor enzime implicate în glicoliza anaerobă şi aerobă, în sisteme izolate, nu a indicat existenţa unei radiosensibilităţi crescute (23).

Ţinînd seama de existenţa unor numeroase controverse asupra modificărilor glicolizei anaerobe în urma iradierii este greu de găsit o explicaţie satisfăcătoare. Mai verosimilă ar fi admiterea unor perturbări în reglare. Rolul important al adenin nucleotizilor în reglarea glicolizei a fost fundamentat de numeroase lucrări, în special ale lui Atkinson (24) şi Stadtman (25). Astfel raportul ATP/ADP pare să fie regulatorul primei părţi a glicolizei anaerobe, datorită acţiunii activatoare a ATP asupra hexokinazei şi inhibitoare asupra fosfofructokinazei. Amintim în acest sens că Yamada şi Ohyama (26) au observat pe timocite iradiate o relaţie cantitativă între acumularea de fructozo-1,6-difosfat şi scăderea ATP. Totuşi scăderea ATP observată de mulţi autori nu poate explica decît parţial modificarea primei etape a glicolizei în urma iradierii. Ţinem să amintim creşterea activităţii glucokinazei, după iradiere o enzimă „adaptativă", care diferă în unele proprietăţi de hexokinază, în sensul unei specificităţi mai mari de substrat, unei constante Michaelis mai mari şi lipsei unei inhibiţii prin glucozo-6-fosfat (27).

Etapa finală a glicolizei anaerobe este supusă unor mari variaţii în urma iradierii. Pe lîngă variaţiile cantitative ale acizilor piruvic şi lactic, atrage atenţia comportarea lacticodehidrogenazei (LDH).

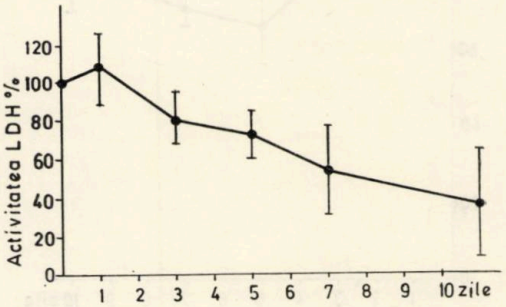


Fig. 3. — Variaţia în timp a activităţii lacticodehidrogenazei (LDH) serice la porci după iradierea cu 340 razi. Variaţia activităţii enzimei s-a raportat la valoarea iniţială pentru fiecare animal în parte şi apoi s-a efectuat calculul statistic.

În figura 3 se prezintă variaţia activităţii lacticodehidrogenazei din sîngele porcilor iradiaţi cu 340 razi. La această specie de animale LDH prezintă cea mai mare variaţie dintre parametrii cercetaţi, scăderea fiind cu atît mai accentuată cu cît animalul se apropie de exitus. Rezultatele noastre concordă cu datele altor autori (28). Majoritatea lucrărilor axate pe comportarea acestei enzime în boala de iradiere s-au ocupat de modifica-

rea activității în primele 2–24 ore de la iradiere, creșterile par să fie datorate unor modificări morfologice, respectiv, cînd se constată o creștere a activității enzimei din sînge, proporțională cu doza între 300 și 900 R (29), și o scădere a celei din splină. Dienstbier și col. (30) au arătat că după administrarea unor radioprotectori ca AET (aminoetil isotiouroniu HBr) se produce o acumulare a acestuia în miocard, iar nivelul LDH sanguin crește mai mult decît valorile induse de iradiere. Cercetătorii cehoslovaci au atribuit o importanță mare variației isoenzimelor LDH_1 și LDH_5, revenind însă ulterior asupra acestor modificări (31).

La început modificarea activității LDH a fost explicată prin eliberarea enzimei din celulele radiosensibile în urma proceselor necrotice induse de iradiere. Recent, Winstead și Reece (32) au arătat că prin iradierea enzimei purificate se produc o serie de modificări calitative cum ar fi oxidarea grupărilor SH, alterarea centrului de legătură al enzimei cu NADH, scăderea afinității pentru piruvat. De asemenea, Olinescu și Vișinescu (33), prin studii termodinamice au observat după iradierea unor enzime pure sau a proteinelor serice, modificări calitative în sensul unei rigidități a moleculei proteice, îngreunînd conformaționarea necesară activității catalitice. Aceste date recente sugerează importanța modificărilor calitative provocată de iradiere prin efectul indirect al radicalilor radiolitici și cu consecințe în reglarea enzimei.

Deoarece această etapă a glicolizei prezintă o importanță metabolică, în continuare am cercetat variația concentrațiilor acizilor lactic și piruvic în hematii, după iradierea porcilor și șobolanilor.

În cazul porcilor, variația raportului lactat/piruvat nu este semnificativă (fig. 4), în schimb la șobolani, unde s-a putut urmări modificarea

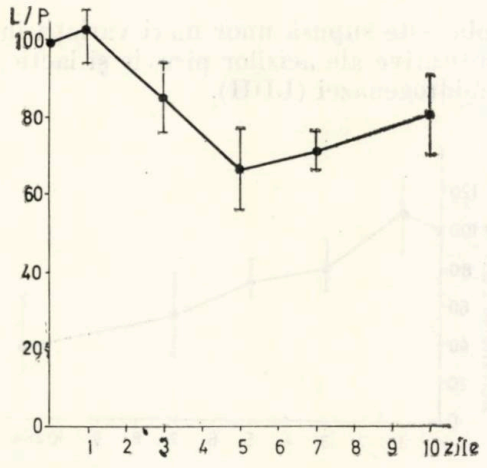


Fig. 4. — Modificarea în timp a raportului lactat/piruvat (L/P) din sînge la porci după iradierea cu 340 razi. Variația raportului L/P s-a raportat la valoarea inițială pentru fiecare animal în parte și acestea au fost prelucrate statistic.

raportului în funcție de doza de iradiere, se constată (tabelul 1) o scădere progresivă o dată cu creșterea dozei. Trebuie menționat că atît acidul lactic cît și cel piruvic cresc în sîngele animalelor iradiate, dar raportul scade datorită creșterii mai mari a acidului piruvic. Creșterea acizilor organici după iradierea diferitor specii de animale a mai fost semnalată și de alți autori (34, 35). Creșterea mare a acidului piruvic produce o inhibi-

ţie a glicolizei prin acţiune la nivelul fosfogliceraldehid dehidrogenazei (36), a LDH, cît şi inactivarea catalazei (37). După cum arată rezultatele prezentate în tabelul 1, o dată cu creşterea dozei de iradiere, la şobolani, are loc o scădere mai accentuată a raportului lactat/piruvat. O scădere şi mai marcată s-a obţinut prin injectarea unei doze mari de vitamină K_3 (presupus radiosensibilizator) înainte de iradierea animalului.

Tabelul 1

Variaţia glucozei, glutationului redus şi a acizilor lactic şi piruvic în sînge de şobolan după 24 ore de la iradiere cu diferite doze

Doză R	Glucoză mg%	Glutation μ Moli $\cdot 10^{-2}$	Lactat m Moli/1	Piruvat mMoli/1	L/P
0	102± 8,5	62±4,2	4,75±0,7	0,53±0,06	9,0
400	105±10,5	62±4,5	5,40±0,4	0,70±0,02	7,2
500	114±12,0	66±8,3	5,40±0,6	0,82±0,04	6,5
600	128±14,1	52±2,7	5,64±0,6	0,98±0,06	5,7
800	141±18,2	51±8,2	5,33±0,7	1,05±0,05	5,0

Tabelul 2

Efectele iradierii şi ale vitaminei K_3 asupra raportului lactat/piruvat în sînge de şobolan după 24 ore de la iradierea cu 700 R

Condiţii experimentale	Lactat mMoli/1	Piruvat mMoli/1	L/P
normal	4,75±0,7	0,53±0,06	9,0
5 mg vit. K_3	3,95±0,4	0,51±0,06	7,7
10 mg vit. K_3	5,2 ±0,5	0,63±0,08	8,2
iradiat	5,4 ±0,6	0,82±0,04*	6,6*
Ir. + vit. K_3 (5 mg)	4,9 ±0,9	0,58±0,07	8,5
Ir. + vit. K_3 (10 mg)	4,3 ±0,8	0,94±0,04*	4,4*

* = Statistic semnificativ $P < 0{,}01$ după testul lui Student. Şobolanii au fost injectaţi intraperitoneal cu vitamină K_3(FIOLA) la 30 minute înaintea iradierii sau numai injectaţi cu concentraţiile indicate.

Aşa cum rezultă din tabelul 2, o scădere semnificativă a raportului lactat/piruvat se obţine numai în urma administrării unei doze mari de vitamină K_3, asociată cu iradierea, deoarece administrarea singură a acestui compus nu modifică semnificativ raportul studiat. Numai în cazul unor doze de iradiere letale 100 %, măsurarea raportului lactat/piruvat ar putea fi folosită ca un indiciu al intensităţii iradierii, iar faptul că ea nu este recomandată se datoreşte atît tehnicilor laborioase, dar mai ales variaţiei mari a animalelor de control (factori individuali, hrană, traumatisme etc.). În plus, prin compararea rezultatelor noastre (tabelul 1, fig. 4) există mari variaţii în funcţie de specia animalelor studiate.

Şuntul pentozofosfat este strîns legat de glicoliza anaerobă în special prin glucozo-6-fosfat. În urma iradierii s-a constatat o scădere a activităţii şuntului în hematii la 24 ore de la iradierea cîinilor cu o doză letală (38) sau a şobolanilor (39). După cum a arătat Trebuhina (40), după 10 zile de la iradiere apare o nouă scădere a activităţii şuntului, datorită inactivării transcetolazei. Activitatea scăzută a şuntului are repercusiuni asupra producerii ribozei necesare biosintezei nucleotizilor şi acizilor nucleici.

Inhibiția șuntului poate fi datorită și lipsei unei concentrații adecvate în $NADP^+$.

Din rezultatele prezentate a reieșit posibilitatea implicării nucleotizilor în mecanismul modificărilor observate în metabolismul glucidic, cu atît mai mult cu cît acești adenin nucleotizi acționează ca regulatori în reacțiile limitante ale glicolizei (fosfofructokinază, hexokinază). În acest sens prezentăm modificările cantitative ale nucleotizilor în boala de iradiere. Scăderea conținutului ATP în organele animalelor iradiate este unanim confirmată (38—41). Scăderea observată are loc în primele două zile după iradiere, fiind însoțită de o creștere a AMP. După cît se pare, această scădere a ATP s-ar datora unei activități crescute a ATP-azei eliberată în țesuturi prin leziunea membranei celulare. Aceeași scădere s-a constatat și în conținutul NAD^+ și $NADP^+$ după 3—5 zile de la iradiere, atît în ficat și creier (42) cît și în hematii (43). Scăderea este mai evidentă la formele reduse din nicotinadenin nucleotizilor și se datorește după cît se pare activității crescute a nucleotizilor și nucleotid pirofosfatazelor hidrolizante (42). Ababei și Filip (44) au observat o creștere compensatoare a biosintezei acestor coenzine, eficace doar în cazul unei doze moderate de iradiere. Efectul stimulator al administrării de nicotinamidă asupra biosintezei acestor coenzime nu mai acționează în cazul animalelor iradiate. Este interesant de menționat că, în ciuda unei degradări accelerate și a existenței unor modificări în biosinteza nicotin coenzimelor nu s-a observat eliminarea urinară crescută a metaboliților, așa cum este cazul deoxicitidinei, provenită din catabolizarea excesivă indusă de iradiere a bazelor pirimidinice.

După părerea noastră, existența unei radioleziuni în procesul biosintezei NAD și NADP ar trebui să fie legată de aportul de ribozo-5-fosfat, deoarece atașarea acestuia (ca fosforibozil pirofosfat) de acidul orotic este reacția limitantă. În acest sens reamintim că afectarea șuntului pentozofosfat în urma iradierii micșorează formarea ribozo-5-fosfatului. Tot în legătură cu rolul nicotinadenin nucleotizilor trebuie menționată implicarea lor în mecanismele de reparare celulară în urma iradierii. Într-adevăr Sanner (45), Singh și Ormerod (46) au demonstrat capacitatea de captator de radicali liberi a NADH față de electronii termici sau față de radicalii rezultați prin pierderea unui atom de hidrogen.

Un alt exemplu al implicării adenin nucleotizilor în perturbarea metabolică a glucidelor este cancerul, cu atît mai mult cu cît iradierea terapeutică produce de multe ori forme variate ale bolii de iradiere. De altfel s-a remarcat de mult asemănarea unor radioleziuni biochimice sau morfologice cu cele neoplazice. Din multitudinea datelor biochimice nu menționăm decît glicoliza. Astfel se știe că Crabtree a observat încă din 1935 scăderea glicolizei în urma iradierii tumorilor, fără ca respirația să fie afectată. Această constatare a fost confirmată (47). În 1958, bazați pe multe date experimentale, Warburg și col. emit ipoteza după care inhibarea glicolizei în urma iradierii tumorilor se datorește H_2O_2 format din radioliza apei. S-a confirmat că prin adăugarea H_2O_2 unei suspensii de celule ascitice se produce inhibarea glicolizei la nivelul fosfogliceraldehid dehidrogenazei, cît și pierderea NAD din celulă, urme de metale grele catalizînd acest efect. Ulterior, prin reluarea pe scară largă a acestor experiențe s-a găsit

că inhibarea glicolizei în urma iradierii tumorilor se datorește pierderii NAD (50). H_2O_2 ca și iradierea produce scăderea NAD, datorită accelerării degradării enzimatice. În urma iradierii sinteza NAD nu este afectată. După cum au arătat Hilz și col. (51) nicotinamida în concentrații mici ($10^{-5} + 10^{-4}$ M) inhibă NAD nucleotidaza, ori se pare că în urma iradierii se produce o accelerare a ieșirii nicotinamidei din celulă (52), prin creșterea permeabilității membranelor.

Desigur, iradierea tumorilor produce o suită de efecte biochimice în care inhibarea glicolizei anaerobe constituie doar un exemplu. Formarea H_2O_2 în urma iradierii, deși insuficient fundamentată experimental cît și acțiunea sa inhibitoare asupra glicolizei au dus la încercarea de mărire a radiosensibilității tumorilor prin perfuzia unei soluții diluate de H_2O_2 la pacienți înaintea iradierii (53), ulterior abandonată.

Iradierea interferă și cu alte reacții din glicoliză producînd inhibarea fosfofructokinazei și piruvat kinazei, enzime regulatoare ale glicolizei și supuse controlului alosteric prin adenin nucleotizi. În plus prin inhibarea glicolizei, se micșorează și mai mult cantitatea de ATP disponibil crescînd și mai mult inhibiția glicolizei (54).

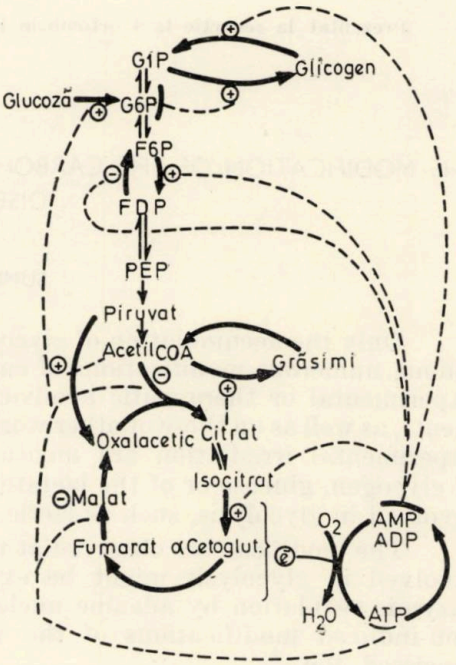


Fig. 5. — Reprezentarea schematică a controlului prin adenin nucleotizi a glicolizei și ciclului Krebs după Atkinson (24). Prin simbolul e^- este reprezentat sistemul transportor de electroni fosforilant. Prin linii pline se prezintă direcția principalelor reacții, iar prin linii întrerupte acțiunea adenin nucleotizilor. Acțiunea activatoare este indicată prin ⊕, iar o inhibiție prin ⊖.

Privit în ansamblu, în urma iradierii unui organism din punctul de vedere expus, se produce încă din primele ore o scădere a adenin nucleotizilor, mai evidentă în cazul ATP, în funcție de intensitatea iradierii. Conform figurii 5, prin modificarea raportului normal ATP/ADP + AMP au loc modificări în reglarea activității unor enzime din glicoliză, glicogenoliză prezentate în lucrare. Controlul activității enzimatice prin

adenin nucleotizi din cadrul glicolizei coincide cu etapele la care s-au observat cele mai multe modificări în urma iradierii. În general modificările observate în primele zile după iradiere sînt compensate datorită capacității adaptative a organismelor. Totuși ulterior, datorită persistenței unor leziuni neevidente, cum ar fi în biosinteza sau catabolismul adenin nucleotizilor apar noi modificări în reglarea proceselor enzimatice observabile prin variația cantitativă a unor enzime sau metaboliți.

CONCLUZII

În urma iradierii experimentale s-au observat modificări în concentrațiile glicogenului, glucozei, a raportului lactat/piruvat sau în activitatea lactatdehidrogenazei, cu variații în funcție de specie.

Aceste modificări, cît și altele prezentate în lucrare, ar putea fi explicate prin alterarea reglării activității enzimatice de către adenin nucleotizi. Scăderea acestor adenin nucleotizi, în special a ATP, se datorește creșterii catabolizării lor indusă de iradiere.

Prezentat la redacție la 4 octombrie 1973

Clinica de radiobiologie
Spitalul clinic Fundeni
București

THE MODIFICATION OF THE CARBOHYDRATE METABOLISM IN RADIATION DISEASE

SUMMARY

Only the accumulation of glycogen and glucose in tissues is accepted among numerous modifications of carbohydrate metabolism following the experimental or therapeutic irradiation. On the basis of original experiments, as well as on those of other workers, the main perturbations following experimental irradiation are mentioned, namely in the concentrations of glycogen, glucose or of the lactate/pyruvate ratio and of some enzymes involved in glycolysis, such as lactic dehydrogenase.

The modifications observed at the level of glycogen of some enzymes involved in glycolysis might be explained by the perturbation of the enzymic regulation by adenine nucleotides ATP, NAD^+, $NADP^+$. Radiation-induced modifications of the adenine nucleotide metabolism are discussed too.

BIBLIOGRAFIE

1. V. W. Valentine, J. H. Follette, J. S. Lawrence, J. Clin. Invest.**32**, 251 (1953).
2. G. Ceriotti, A. N. Frank, Clin. Chim. Acta, **24**, 311 (1969).
3. J. Chagnon, J. Jeandet, H. Lestredat, Rev. Et. Clin. Biol., **6**, 953 (1961).
4. T. E. Friedeman, G. E. Haugen, J. Biol. Chem., **147**, 415 (1943).

5. E. Beutler, O. Deron, B. Kelly, J. Lab. Clin. Med., **61**, 882 (1963).
6. C. Streffer, Int. J. Rad. Biol,. **11**, 179 (1966).
7. J. Berndt, R. Gaumert, Naturwiss., **53**, 307 (1966).
8. L. Hansen Int. J. Rad. Biol., **12**, 367 (1976).
9. J. Berndt, O. Ulbrich, Strahlenterapie **133**, 288 (1967).
10. M. Z. Ibrahim, H. Atlan, J. Miguei, Red. Res., **43**, 341 (1970).
11. R. E. Kay, C. E. Enteman, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **91**, 143 (1956).
12. C. B. Schechter, M. Supplee, C. E. Enteman, Am. J. Physiol., **169**, 508 (1953).
13. J. Kalouser, Z. Dientsbier, Int. J. Rad. Biol., **6**, 271 (1963).
14. E. Lohr, Strahlenterapie, **130**, 528 (1966).
15. J. Berndt, R. Gaumert, Int. J. Rad. Biol., **12**, 453 (1967).
16. J. G. Coniglio, D. L. Cole, G. W. Hudson, Fed. Proc., **18**, 206 (1959).
17. H. Wagner, K. Bernhardt, Helv. Physiol. Pharmacol.Acta, **19**, 113 (1961).
18. I. Y. Kiryanova, S. P. Grozdov, Radiobiologhia, **10**, 470 (1970).
19. W. C. Levin, M. Schneider, J. Lab. Clin. Med., **52**, 921 (1958).
20. R. M. Sutherland, A. Pihl, Rad. Res., **34**, 335 (1968).
21. I. Mărgineanu, R. Olinescu, St. cercet. biochim., **16**, 209 (1973).
22. J. Berndt, R. Gaumert, Int. J. Rad. Biol., **11**, 593 (1966).
23. D. Bonsignore, C. Canonica, L. Lenzerini, Ital. J. Biochem., **14**, 1 (1965).
24. D. E. Atkinson, Ann. Rev. Biochem., **35**, 85 (1966).
25. E. R Stadtman Adv. Enzymol., **28**, 41 (1966).
26. T. Yamada, H. Ohyama, Int. J. Rad. Biol., **14**, 169 (1968).
27. B. Boreeback, S. Abraham, Biochim. Biophys. Acta, **90**, 451 (1964).
28. M. Tocca, R. Stornelli, Giorn. Medic. Milit., **114**, 767 (1964).
29. Y. Hori, Y. Takamori, K. Nishio, Rad. Res., **34**, 411 (1968).
30. K. Korulek, M. Arient, Z. Dientsbier, Atomkernenergie, **15**, 78 (1970).
31. V. Volek, Z. Dienstbier Strahlenterapie, **123**, 125 (1964).
32. J. A. Winstead, T. C. Reece, Rad. Res., **41**, 125 (1970).
33. R. Olinescu, A. Vişinescu, Rev. rom. Biochim., **9**, 243 (1972).
34. T. R. Henderson, R. K. Jones, Clin. Chem., **16**, 697 (1970).
35. T. C. Welbourne, G. B. Spur, Rad. Res., **41**, 352 (1970).
36. J. R. Williamson, J. Biol. Chem., **240**, 2308, (1965).
37. R. Olinescu, M. Cotae, Rev. roum. Biochim., **9**, 157 (1972).
38. A. G. Kuzovkov, B. M. Ivanov, Radiobiologhia, **8**, 717 (1968).
39. J. Sonka, L. Malina, Z. Dienstbier, Agresologie, **6**, 205 (1965).
40. R. V. Trebuhina, Radiobiologhia, **6**, 766 (1966).
41. F. Bresciani, F. Aurichio, Rad. Res., **22**, 463 (1964).
42. C. Streffer, J. Vitaminol., **14**, 130 (1968).
43. E. Pauşescu, T. Teodosiu, R. Chirvasie, Rad. Res., **51**, 302 (1972).
44. L. Ababei, M. Filip, Int. J. Rad. Biol., **16**, 563 (1969).
45. T. Sanner, Rad. Res., **26**, 95 (1965).
46. B. B. Singh, M. G. Ormerod, Bioch. Biophys. Res. Comm., **25**, 28 (1966).
47. J. A. Ontko, W. R. Moorhead, Rad. Res., **23**, 133 (1964).
48. O. Warburg, K. Gawehn, G. Lorenz, Archiv. Biochem. Biophys., **78**, 573 (1958).
49. O. Warburg, K. Gawehn, A. W. Gessler, Z. Naturforsch., **18 b**, 654 (1963).
50. T. J. Yamata, Rad. Res., **39**, 41 (1968).
51. N. Hilz, P. Hlavica, B. Bertram, Biochem. Z., **338**, 283 (1963).
52. G. B. Gerber, J. Deroo, Intern. J. Rad. Biol., **22**, 351 (1972).
53. J. McNaughton, Brit. J. Radiol., **41**, 490 (1968).
54. D. Brandes, K. Sloan, F. Bloendown, Cancer Res., **27**, 731 (1967).

ST. CERC. BIOCHIM., 17, 1, 59—69 (1974)

IMUNOGENICITATEA UNOR GLICOPROTEINE TUMORALE TOTALE ŞI DESIALIZATE

T. RUSĂNESCU şi R. MURGOCI

Rezumat. — Comparativ cu albumina serică umană, α_1-glicoproteinele tumorale s-au caracterizat printr-o reactivitate antigenică mai promptă şi de lungă durată. Răspunsurile imune primare şi secundare ale glicoproteinelor au fost însoţite de oscilaţii semnificative ale acizilor sialici, invers proporţionale cu intensitatea răspunsului imun.

În general, tratarea cu neuraminidază a glicoproteinelor tumorale nu a schimbat profilul lor antigenic.

Imunoprecipitinele dozate la trei zile după administrarea antigenelor, au prezentat valori sensibil apropiate pentru glicoproteinele tumorale totale şi aceleaşi glicoproteine tumorale desializate, cu excepţia unei glicoproteine ascitice umane, cu care s-au obţinut rezultate contradictorii, desializarea fiind urmată în acest caz, de creşterea antigenicităţii.

În ultimii ani s-au acumulat o multitudine de date experimentale care indică modificările de structură ale suprafeţei celulare, ca o caracteristică a conversiunii celulei de la starea normală la cea malignă ; iar suprafaţa externă a celulelor, bogată în glicoproteine, reflectă starea fiziologică a acestor celule. De asemenea, glicoproteinele membranelor celulare sînt purtătoare, cel puţin în parte, ale caracterelor imunologice celulare (1—3].

Acest strat glicoproteic care acoperă suprafeţele celulare a fost cercetat în : tumori benigne, carcinoame, neoplaziile pielii, maladiile de sistem etc. şi s-a constatat că acest înveliş a crescut foarte mult în timpul malignizării, modificările chimice ale glicoproteinelor asociindu-se cu modificările funcţionale ale membranelor celulare maligne [4—6].

Alterările funcţionale ale celulei maligne se manifestă, printre altele, şi prin : lipsa inhibiţiei de contact, creşterea rigidităţii membranei, schimbările de densitate în sarcina electrică, apariţia de noi antigene etc., iar parte din aceste modificări se datoresc unui component cu poziţie terminală în structura glicoproteinelor — acidul sialic [7—9].

Studiindu-se proprietăţile antigenice ale α_1-glicoproteinelor tumorale, s-a remarcat proporţionalitatea inversă dintre răspunsul imun umoral primar şi secundar şi conţinutul de acizi sialici serici la animalele imunizate [10—13].

De aceea, în această lucrare s-a cercetat răspunsul imun umoral dat de glicoproteinele tumorale totale şi aceleaşi glicoproteine tratate cu neuraminidază, pentru desializarea lor.

MATERIAL ŞI METODE

Experienţele s-au efectuat cu şobolani Wistar comuni, adulţi, cu greutate de 120—150 g, imunizaţi şi hiperimunizaţi cu următoarele α_1-glicoproteine tumorale [1]:

1. α_1-glicoproteină extrasă din tumoră umană solidă,
2. α_1 " " " ascită umană.
3. α_1 " " " ascită Ehrlich de şoarece.

Fiecare lot experimental a cuprins cinci şobolani şi a fost dublat de un lot martor cu animale normale netratate.

Răspuns primar: Imunizarea s-a efectuat cu 0,2 mg α_1-glicoproteină în 0,2 ml ser fiziologic/şobolan, administrată i.p.

Răspuns secundar: S-a realizat prin administrarea i.p. a α_1-glicoproteinelor tumorale — 0,2 mg/ml în adjuvant Freund incomplet; injectarea repetîndu-se la 21 zile.

Urmărirea răspunsului primar şi secundar s-a efectuat la următoarele intervale de timp: 2h, 24h, 5 zile, 14 zile, 21 zile, 28 zile, 5, 6, 7, 8 săptămîni.

Schema de imunizare şi hiperimunizare este proprie şi stabilită în urma unor testări prin care s-a urmărit optimizarea răspunsului imun produs de antigenele α_1-glicoproteice.

În aceste testări s-au avut în vedere următorii parametri: cantitatea de antigen, calea de administrare a antigenului, asocierea glicoproteinelor cu diferiţi adjuvanţi, intervalul de timp în administrarea repetată a antigenului.

Anticorpii serici — s-au pus în evidenţă prin: 1) *Testul de imunodifuzie* Ouchterlony [2], intensitatea testului apreciindu-se semicantitativ de la 0 la +5; 2) *Hemaglutinarea* [14] — s-a efectuat prin metoda Boyden, utilizînd hematii de oaie tanate, tratate cu antigenele utilizate.

Acizii sialici din antiserurile glicoproteice s-au determinat prin metoda Warren [15].

În partea a doua a experimentului s-au utilizat α_1-glicoproteine tumorale totale şi desializate prin tratare cu neuraminidază [4—5]. Aceste glicoproteine au fost extrase din: ascită Ehrlich, ascită Guérin, tumoră Jensen, ascită umană.

În glicoproteinele extrase, totale şi desializate, s-au determinat următoarele monozaharide: acizi sialici [15], fucoză [16], hexozamine [17], hexoze totale [18], manoză [19].

Cu aceste glicoproteine s-au imunizat şobolani Wistar comuni, prin administrarea unică de 0,2 mg glicoproteină în 0,2 ml soluţie salină fiziologică.

A treia zi de la injectare s-au determinat cantitativ imunoprecipitinele din antiseruri [20]. Calculele s-au efectuat în funcţie de o curbă etalon de albumină serică bovină.

Fiecare lot experimental a cuprins 5—10 şobolani.

Rezultatele s-au exprimat în μg imunoprecipitine/0,1 ml antiser.

REZULTATE

Răspuns imun primar produs de α_1-glicoproteinele tumorale

Figura 1. — Din reprezentarea grafică a intensității testului de imunodifuziune și a concentrației acizilor sialici serici se pot observa următoarele aspecte :

a) Glicoproteinele tumorale produc un răspuns imun primar deosebit de rapid (2h), care scade pînă la sfîrșitul intervalului observat (9 zile).

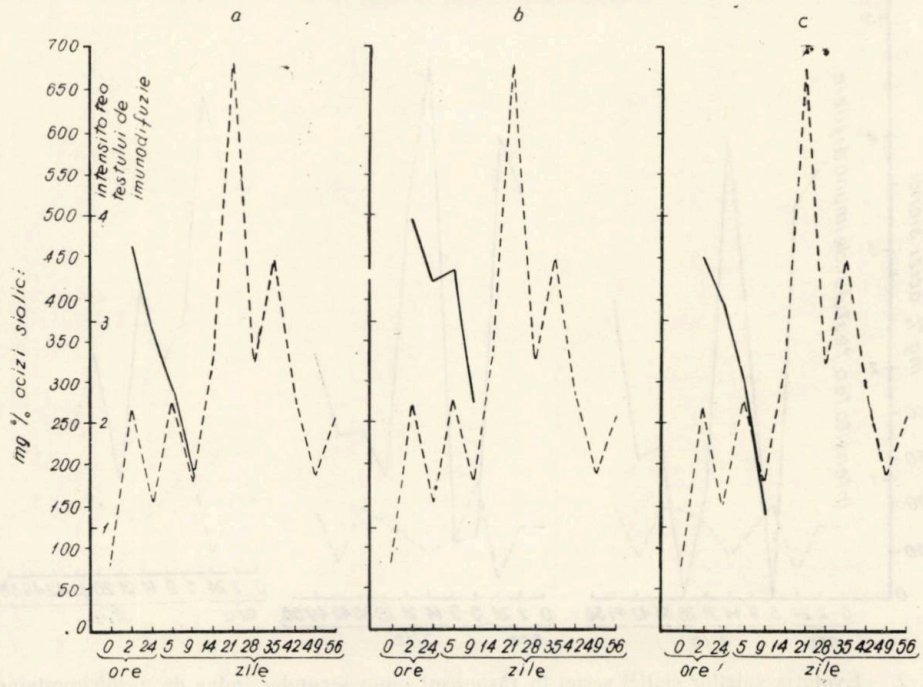


Fig. 1. — Evoluția acizilor sialici serici în răspunsul imun primar indus de α_1-glicoproteine tumorale. *a*. α_1-glicoproteină din tumoră umană solidă; *b*. α_1-glicoproteină din ascită de șoarece; *c*; α_1-glicoproteină din ascită de șoarece; – – – – acizi sialici mg/100 ml ser, ——— intensitatea testului de imunodifuzie (media ponderată a aprecierii semicantitative 0 – + 5).

b) Acizii sialici cresc în prima parte de la 80 mg % (valoarea normală) la 260—270 mg %, prezentînd oscilații periodice cu maxime și minime.

c) Cantitatea de acizi serici continuă să crească, ajungînd la 630 mg % în ziua a 21-a, deși testul de imunodifuzie este negativ din ziua a 9-a.

Răspuns imun secundar indus de α_1-glicoproteinele tumorale

Figura 2. — În răspunsul secundar produs de aceleași glicoproteine tumorale se constată de asemenea o comportare neobișnuită a acestor antigene :

a) Un răspuns imun prompt după primele ore, care scade foarte mult în ziua a 5-a, revenind la valori crescute în ziua a 14-a.

b) Se remarcă o periodicitate foarte marcată a răspunsului imun, fără o altă administrare de antigen.

c) Acizii sialici serici prezintă valori foarte scăzute comparativ cu valorile înregistrate în ser după imunizare unică. La 24 h se înregistrează valori foarte mici : 40 mg%, 38 mg%, pentru cele trei loturi hiperimunizate (valoarea normală — 80 mg%).

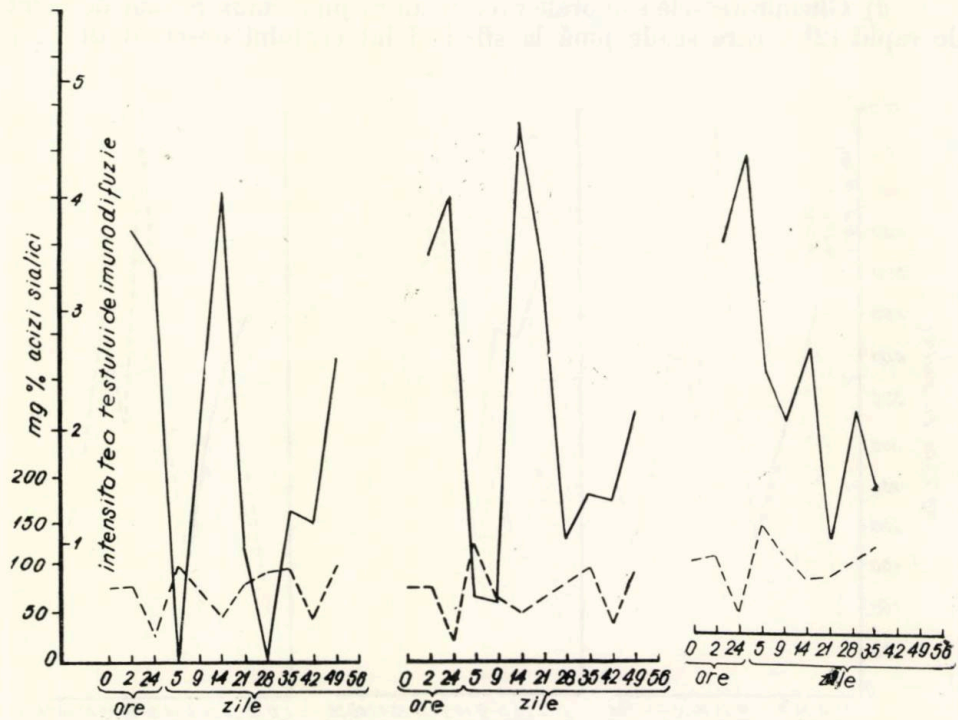


Fig. 2. —Evoluţia acizilor sialici serici în răspunsul imun secundar indus de α_1-glicoproteine tumorale.

a. α_1—glicoproteină din tumoră umană solidă; *b.* α_1—glicoproteină din ascită umană; *c.* α_1—glicoproteină din ascită de şoarece. — — — — acizi sialici mg/100 ml ser, ——— intensitatea testului de imunodifuzie (media ponderată a aprecierii semicantitative 0— +5).

d) Minimele răspunsului imun corespund unor maxime ale concentraţiei acizilor sialici serici.

e) După hiperimunizare apare o diferenţiere în răspunsul imun secundar pentru glicoproteina extrasă din ascita Ehrlich de şoarece.

Comparaţia imunogenicităţii glicoproteinelor tumorale cu a albuminei serice umane

Figura 3. — Pentru a caracteriza activitatea antigenică neobişnuită a glicoproteinelor tumorale, s-au efectuat imunizări paralele cu albumină serică umană, luată ca antigen etalon şi α_1-glicoproteine extrase dintr-o tumoră umană şi din tumoră Jensen de şobolan.

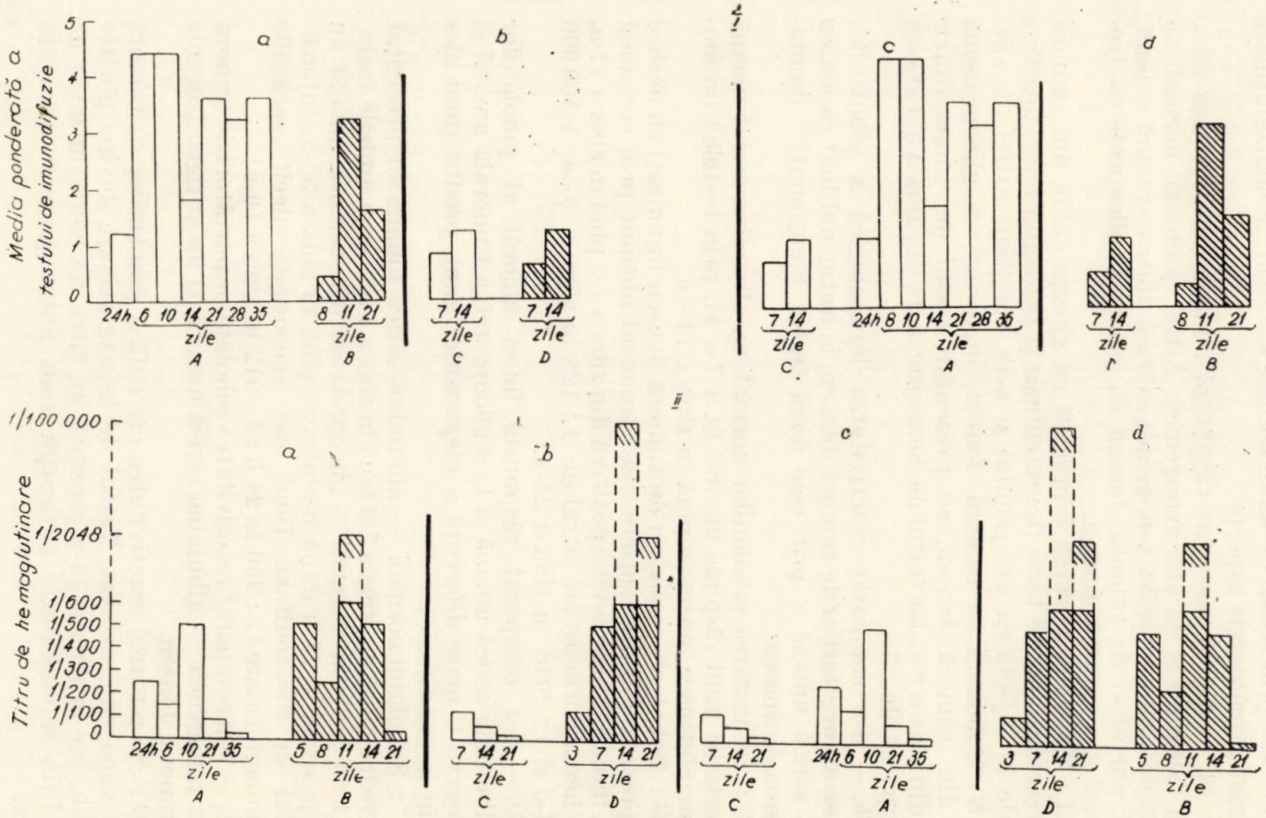


Fig. 3. — Intensitatea testului de imunodifuzie (I) şi titrul de hemaglutinare (II) după imunizare cu albumină serică umană şi α_1-glicoproteine tumorale.

A. şobolani normali + glicoproteină tumorală umană; *B*. şobolani grefaţi cu tumoră Jensen + glicoproteină din tumoră Jensen; *C*. şobolani normali + albumină serică umană; *D*. şobolani grefaţi cu tumoră Jensen + albumină serică umană.

▭ şobolani Wistar normali ▨ şobolani Wistar grefaţi cu tumoră Jensen.

La aceste imunizări s-au utilizat loturi de şobolani Wistar normali şi loturi de şobolani Wistar purtători de tumoră Jensen. Răspunsul imun umoral s-a cercetat prin testul de imunodifuzie şi testul de hemaglutinare şi s-au remarcat următoarele aspecte :

Figura 3a. — A fost cercetat răspunsul imun umoral produs de o glicoproteină izogenică şi de una xenogenică. Astfel, şobolanii normali au fost imunizaţi cu o glicoproteină xenogenică extrasă dintr-o tumoră umană, iar şobolanii purtători de tumoră Jensen au primit o glicoproteină izogenică, extrasă din tumoră Jensen.

Lotul A : Şobolanii normali imunizaţi cu glicoproteină din tumoră umană au prezentat ambele teste (imunodifuzie şi hemaglutinare) pozitive după 24 h de la injectarea antigenului şi s-au menţinut astfel 35 zile.

Lotul B : Şobolanii cu tumoră Jensen, imunizaţi cu glicoproteină extrasă tot din tumoră Jensen, au prezentat testul de imunodifuzie pozitiv abia din ziua a 8-a, iar testul de hemaglutinare din ziua a 5-a şi s-au negativat după 21 de zile.

Fig. 3b. — S-a comparat reactivitatea imunologică a şobolanilor normali cu cea a purtătorilor de tumoră Jensen, la antigenul luat ca etalon — albumina serică umană — prin cele două teste menţionate : imunodifuzia şi hemaglutinarea.

Lotul C : Imunizarea şobolanilor normali cu albumina serică umană a permis decelarea unui răspuns umoral în a 7-a zi, prin testele : imunodifuzie şi hemaglutinare, pozitive pînă în ziua a 14—a.

Lotul D : Şobolanii purtători de tumoră Jensen imunizaţi cu acelaşi antigen au prezentat o diferenţiere din răspunsul obţinut prin cele două teste. Astfel, imunodifuzia devine pozitivă din ziua a 7-a pînă în ziua a 14-a, iar testul de hemaglutinare are titrul de 1 : 128 în ziua a 3—a 1:100 000 în ziua a 14-a şi 1 : 2048 în ziua a 21-a.

Fig. 3c. — S-a comparat răspunsul imun umoral al şobolanilor normali la albumina serică umană şi la o glicoproteină tumorală umană şi s-a putut observa o mare diferenţă a răspunsului imun produs (mai ales prin testul de imunodifuzie).

Lotul C : Şobolanii normali + albumină serică umană au prezentat reacţii pozitive începînd din ziua a 7-a pînă în ziua a 14-a, prin ambele teste.

Lotul A : Şobolanii normali + glicoproteină din tumoră umană au avut anticorpi serici la 24 h după imunizare, pînă în ziua a 35-a, intensitatea testului de imunodifuzie fiind mai accentuată decît variaţiile titrului de hemaglutinare (1 : 256 la 24 h ; 1 : 512 în ziua a 10-a).

Fig. 3d. — S-a comparat reactivitatea şobolanilor purtători de tumoră la un antigen xenogeneic — albumina serică umană, şi un antigen izogenic extras din tumoră Jensen.

Lotul D : Se remarcă reactivitatea crescută a şobolanilor cu tumoră la antigenul xenogenic utilizat. Testul de hemaglutinare devine pozitiv din ziua a 3-a, iar în ziua a 14-a prezintă un titru de hemaglutinare de 1 : 100 000. Prin imunodifuzie anticorpii s-au putut pune în evidenţă în ziua a 7-a.

Lotul B : Imunizarea şobolanilor purtători de tumoră Jensen cu glicoproteină extrasă din tumoră Jensen, a indus apariţia mai tardivă a anticorpilor serici, putîndu-se evidenţia în a 8-a zi prin imunodifuzie şi în a 5-a zi prin testul de hemaglutinare.

Imunoprecipitine serice în răspunsul imun primar indus de glicoproteinele totale şi desializate

Figura 4. — S-au utilizat ca antigene :

α_1-glicoproteinele extrase din ascită Ehrlich, ascită Guérin, tumoră Jensen, ascită umană I şi II. După tratarea cu neuraminidază pentru îndepărtarea acidului sialic, au fost utilizate la imunizarea unor loturi de animale, paralele cu primele imunizări.

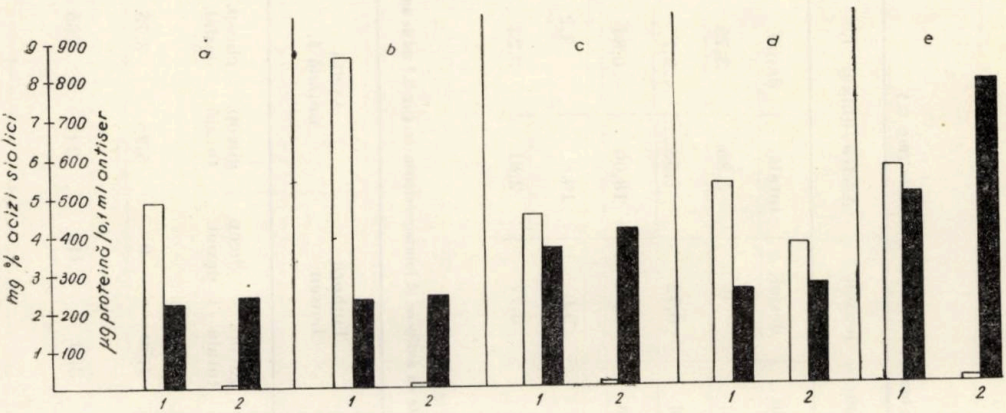


Fig. 4. — Răspuns imun primar indus de α_1-glicoproteine tumorale totale şi desializate şi conţinutul lor de acizi sialici.

a. ascită Ehrlich; *b*. ascită Guérin; *c*. tumoră Jensen; *d*. ascită umană I; *e*. ascită umană II; *1*. glicoproteine totale; *2*. glicoproteine desializate.

acizi sialici imunoprecipitine.

Administrarea s-a făcut i.p. — cu 0,2 mg glicoproteină în 0,2 ml soluţie fiziologică, pentru ambele tipuri de glicoproteine.

Precipitinele serice din antiserurile obţinute de la aceşti şobolani s-au cercetat în ziua a 3-a după imunizare.

Din determinările conţinutului de : acizi sialici, fucoză, hexozamine, hexoze totale, manoză, s-a putut observa că acestea oscilează în limite destul de largi în α_1-glicoproteinele studiate.

Tabela 1. — Astfel, în glicoproteinele totale netratate : acizii sialici au valori între 8,62—4,50 mg%; fucoza prezintă valori între 1,58—0,38 mg%; hexozaminele : 18,63—6,79 mg%; hexozele totale : 10,8—5,60 mg% şi manoza 2,81—1,38 mg%.

Tabela 2. — Prin tratarea cu neuraminidază, acidul sialic a fost îndepărtat total din următoarele glicoproteine : ascită Ehrlich, tumoră Jensen şi dintr-o glicoproteină din ascită umană.

Deşi cele două glicoproteine extrase din ascite umane au avut un conţinut apropiat de acid sialic, 5,25 mg% şi 5,62 mg%, numai una din ele a eliberat total acidul sialic.

Deşi acidul sialic are poziţie terminală în lanţurile oligozaharidice ale glicoproteinelor şi determină multe din proprietăţile fizico-chimice

Tabela 1

Componente ale glicoproteinelor tumorale totale şi desializate (mg %)

Componentul	Ascită Ehrlich		Ascită Guérin		Tumoră Jensen		Ascită umană I.		Ascită umană II.	
	totală	desial.	totală	desial.	totală	desial.	totală.	desial.	totală	desial.
Acizi sialici	4,95	0	8,62	0,75	4,50	0	5,25	3,75	5,62	0
Fucoza	0,60	0,86	1,04	1,08	0,76	0,72	1,58	2,1	0,38	1, 3
Hexozamine	13,32	10,20	6,79	2,47	11,88	1,92	18,00	0,84	18,63	2,28
Hexoze	7,7	6,8	5,6	6,2	10,2	5,0	10,8	3,2	10,2	4,0
Manoza	1,28	2,33	1,46	5,77	0	3,77	2,81	3,22	2,16	3,66

Tabela 2

Conţinutul de acizi sialici înainte şi după desializare ale α_1 – glicoproteinelor utilizate ca antigene şi imunoprecipitinele (μg/0,1 ml de antiser coorespunzătoare).

Componentul	Ascită Ehrlich		Ascită Guérin		Tumoră Jensen		Ascită umană I.		Ascită umană II.	
	glicop. totală	glicop. desial.	glicop. totală	glicop. desial.	glicop. totală	glicop desial.	glicop. totală	glicop. desial.	glicop. totală	glicop desial.
Acizi sialici mg %	4,95	0	8,62	0,75	4,50	0	5,25	3,75	5,62	0
Imunoprecip. μ g/0,1 ml antiser	225	240	235	240	350	412	245	265	505	790

ale acestora, imunogenicitatea lor, exprimată prin imunoprecipitinele antiserurilor, după trei zile, nu a fost influențată de tratarea cu neuraminidază (de desializare), cu excepția unei α_1 -glicoproteine umane.

Se poate conclude că :

1. – Imunoprecipitinele induse de glicoproteina din ascită Ehrlich au fost de 225 μg/0,1 ml antiser pentru glicoproteina totală și 240 μg/ /0,1 ml antiser pentru glicoproteina desializată.

2. – Imunoprecipitinele din lotul glicoproteinei ascită Guérin au fost 235 μg/0,1 ml antiser fără tratament și 240 μg/0,1 ml antiser după desializare.

3. – Glicoproteinele extrase din ascita umană, deși au avut un conținut asemănător de acizi sialici, prin tratarea cu neuraminidază s-au desializat inegal : I – 5,25 mg%; II – 5,62 mg%; iar după desializare : I – 3,75 mg%; II – 0.

Aceste glicoproteine au indus și un răspuns imun primar diferențiat.

Glicoproteinele umane totale au indus : I — 245 μg imunoprecipitine/ /0,1 ml antiser; II — 505 μg imunoprecipitine/0,1 ml antiser; iar aceleași glicoproteine desializate : I — 265 μg imunoprecipitine/0,1 ml antiser; II – 790 μg imunoprecipitine/0,1 ml antiser.

DISCUȚII

După unele observații recente, glicoproteinele care fac parte din membranele celulare dau, cel puțin în parte, profilul antigenic al celulei, contribuind fie la constituirea antigenelor de histocompatibilitate, fie al antigenelor tumoral specifice.

Constatarea că unele tumori pot depăși bariera de incompatibilitate pune problema existenței unui sistem de mascare a antigenelor celulare; acest sistem se crede a fi constituit din anumite glicoproteine constituente ale membranei celulare.

Din rezultatele prezentate în această lucrare, cu privire la utilizarea glicoproteinelor tumorale ca antigene, se poate constata declanșarea unei reactivități imunologice deosebit de prompte și de lungă durată.

Activitatea imunogenică a albuminei serice umane este mult studiată în literatură și, de aceea, a fost luată ca antigen etalon. Utilizarea ei ca antigen la animale normale și purtătoare de tumoră Jensen a permis scoaterea în evidență a reactivității semnificative a șobolanilor purtători de tumoră la un antigen xenogenic (Fig. 3b).

Această reactivare imunologică este deosebit de importantă în tratamentul maladiilor canceroase, la ruperea stării de toleranță instalată la bolnavii cu acest tip de maladii.

Albumina serică umană a indus apariția anticorpilor serici după 7 zile, iar imunizarea cu α_1-glicoproteine tumorale după 2 h și 24 h, reprezentînd o comportare imunologică neobișnuită.

Avînd în vedere fazele ciclului celular, necesare transmiterii informației antigenice și sintezei de anticorpi, ar fi de presupus că aceste antigene glicoproteice produc eliberarea unor anticorpi preformați, nespecifici.

Este cunoscută importanța acidului sialic pentru funcționalitatea membranei celulare, manifestată prin : menținerea sarcinii electrice a celulei, rigiditatea celulară, determinarea migrării celulare etc. (22).

De asemenea, se știe că acidul sialic din glicoproteinele membranelor celulare ale celulelor transformate de virusuri cancerigene este scăzut, comparativ cu cel al membranelor neinfectate (23, 24).

Din experiențe in vivo [8, 9] s-a constatat că tratarea celulelor cu neuraminidază crește imunogenicitatea celulelor normale in vitro și in vivo.

Controversa asupra acidului sialic, care poate facilita sau perturba antigenicitatea celulelor tumorale, este mult studiată în literatură și rezultatele sînt contradictorii [4–7]. Glicoproteinele studiate de noi, cuprinzînd cantități variabile de acid sialic, am cercetat acțiunea neuraminidazei asupra acțiunii lor antigenice.

Prin tratarea a 5 glicoproteine tumorale diferite cu neuraminidază, am putut constata că îndepărtarea parțială sau chiar totală a acidului sialic nu schimbă întotdeauna, răspunsul imun primar înregistrat prin dozarea imunoprecipitinelor, la trei zile după administrarea antigenului, indicînd că acidul sialic, ca monozaharid terminal, nu reprezintă o grupare determinantă obligatorie a α_1-glicoproteinelor. Rezultate asemănătoare indică și A. Shimada și colab. (21) pentru H–2 alloantigeni.

α_1-glicoproteinele ascitice, tratate sau nu cu neuraminidază, determină apariția unei cantități asemănătoare de precipitine.

Se remarcă, de asemenea, că cele două glicoproteine ascitice umane, deși au avut un conținut asemănător de acizi sialici și celelalte monozaharide, determină un răspuns primar foarte diferit : I – 254 μg imunoprecipitine/0,1 ml ser și II – 505 μg imunoprecipitine/0,1 ml ser, iar după tratarea cu neuraminidază : I – 265 μg imunoprecipitine/0,1 ml ser și II — 790 μg imunoprecipitine/0,1 ml ser. De aceea se poate afirma că acidul sialic nu maschează determinanții antigenici ai glicoproteinelor studiate de noi și nici nu reprezintă constituent obligatoriu al acestora.

CONCLUZII

1. — α_1-glicoproteinele tumorale reprezintă antigene tumorale deosebit de reactive. Ele permit obținerea unui răspuns imun foarte asemănător, pentru glicoproteine diferite ca origine și structură.

2. — Acidul sialic seric prezintă valori foarte crescute în răspunsul imun primar, și scăzute sub valorile normale în răspunsul imun secundar.

3. — În răspunsul imun secundar produs de α_1-glicoproteinele tumorale, maximelor de intensitate ale testului de imunodifuzie le corespund minime ale concentrației de acizi sialici serici.

4. — Tratarea cu neuraminidază a glicoproteinelor tumorale nu modifică proprietățile lor antigenice, cu excepția unei glicoproteine ascitice umane.

5. — Acidul sialic nu face parte obligatoriu din grupările determinante ale antigenelor α_1-glicoproteice și nu condiționează imunogenicitatea lor.

Prezentat la redacție la 4 iulie 1973

Institutul Oncologic
București

IMMUNOGENICITY OF TOTAL AND DESIALIZATED TUMORAL α_1-GLYCOPROTEINS

SUMMARY

Tumoral α_1-glycoproteins presented faster and prolonged antigenic reactivity than human serum albumin.

Primary and secondary immune responses, given by tumoral α_1-glycoproteins, were accompanied by significant oscillations of sialic acids.

Generally, the neuraminidase treatment of tumoral glycoproteins has not changed their antigenic activity.

The determination of amounts of immunoprecipitins, three days after antigenic administration, presented rather close values for total α_1-glycoproteins and the same desializated tumoral α_1-glycoproteins, excepting a single human ascitic glycoprotein. This human glycoprotein showed contradictory results, in this case, the desialization being followed by increased antigenicity.

BIBLIOGRAFIE

1. S. Harshman, J. Nat. Cancer. Inst., **47**, 871 (1971).
2. I. P. Chiarugi, P. Urbano, J. Gen. Virol., **14**, 133 (1972).
3. J. C. Brow, Exp. Cell Res., **69**, 440 (1971).
4. L. A. Swets, J. Briekhuysen-Davies, Europ. J. Cancer, **8**, 541 (1972).
5. L. Warren, D. Critahley, I. Macpherson, Nature, **235**, 275 (1972).
6. K. J. Isselbacher, New Engl. J. Med., **286**, 929 (1972).
7. C. Glick, C. A. Comistock, M. Coluen, L. Warren, Biochim. Biophys. Acta, **233**, 247 (1971).
8. Om. P. Bah, J. Biol. Chem., **244**, 567 (1969).
9. Han Tiu, Transplantation, **14**, 514 (1972).
10. O. Costăchel, I. Kitulescu, T. Rusanescu, D. Pascu, Congres Internațional de Transplantare, 27 iunie, 1967, Paris.
11. T. Rusanescu, A. Curigut, R. Murgoci, Conf. biochimie, 12 decembrie 1970, București.
12. T. Rusanescu, A. Curigut, R. Murgoci, Oncol. Radiol., **11**, 23 (1972).
13. T. Rusănescu, I. Kițulescu, D. Medeșan, Oncol. Radiol., **12**, 23 (1973).
14. J. Boyden, J. Immunol., **103**, 880, (1969).
15. I. Warren, J. Clin. Invest., **38**, 755 (1957).
16. Z. Dishe, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., **IV**, 711 (1960).
17. R. J. Winzler, Methods of biochemical analiysis, Ed. D. Glick, Academic Press, New York, vol. 2, 1955, p. 299.
18. R. J. Winzler, Methods of biochemical analysis, Ed. D. Glick, Academic Pres, New York, vol. 2, 1955, p. 290.
19. Z. Dische, Methods of Enzymology, Ed. O. Kaplan, Acad. Press, New York, vol. 3, 1957, p. 82.
20. Ga. Leslie, L. W. Clem, J Immunol., **110**, 191 (1973).
21. A. Shimada, S. G. Nathenson, J. Immunol,. **107**, 1197, 1971.
22. S. A. Rosenberg, B. A. Plocinik, Jr. G. N. Rogentine, J. Nat. Cancer Inst. **48**, 1271 (1972).
23. C. Halmmerli, L. Genter., P. Strauli, Acta Citol., **16**, 31 (1972).
24. C. Santer, J. Lindenman and A. Gerber, Europ. J. Cancer, **8**, 451 (1972).
25. E. Brozmanova, B. Skrovina, Neoplasma, **19**, 115 (1972).
26. J. Deman, P. M. Van Valrenberg, P. JOOS, Europ. J. Cancer, **7**, 317 (1971).
27. S. J. Davydova, V. S. Sleapot, Biochimia, **37**, 807 (1972).

ST. CERC. BIOCHIM., 17, 1, 71–76 (1974)

CROMATOGRAFIA PE COLOANĂ DE CARBOXIMETIL - AGAROZĂ A PROTEINELOR SARCOPLASMATICE ŞI EVOLUŢIA ACESTORA ÎN FILOGENIE

HORST D. SCHELL şi MIOARA CÂRSTEANU

Rezumat. — Se cercetează comportarea carboximetil-agarozei, un schimbător de ion acid de tărie medie, recent sintetizat şi încă puţin studiat, ca suport pentru cromatografia pe coloană a proteinelor sarcoplasmatice provenite de la muşchii striaţi ai unor animale cu grade diferite de evoluţie filogenetică (crap, broască, şarpe, porumbel, şobolan alb). Datele experimentale obţinute indică proprietăţi mecanice excelente şi o bună capacitate de separare a gelului perlat de carboximetil-agaroză. Se observă totodată o creştere a numărului de fracţiuni proteice separate din extractele musculare studiate pe măsură ce gradul de evoluţie filogenetică a animalului este mai avansat.

Prin introducerea de grupări carboximetil (CM) în molecula agarozei sau a agarozei legate încrucişat cu epiclorhidrină s-au obţinut schimbători de ioni acizi, de tărie medie (1), care au fost aplicaţi cu succes la separarea cromatografică în coloană a proteinelor serice umane şi de iepure, a imuno-γ-globulinei G umane şi de iepure, a lanţurilor L ale imuno-γ-globulinei de iepure etc. (2).

Prezenta lucrare a avut ca scop să extindă aplicarea acestor noi schimbători de ioni şi la analiza cromatografică a altor categorii de proteine, ca de pildă a celor musculare. Aceasta, pentru a studia pe de o parte capacitatea de separare a acestor schimbători de ioni şi în cazul altor tipuri de proteine, şi pe de altă parte pentru a surprinde eventuale relaţii între gradul de evoluţie filogenetică al vertebratelor şi spectrul cromatografic al proteinelor sarcoplasmatice din muşchii striaţi ai acestora.

MATERIAL ŞI METODE

Prepararea CM-agarozei. Se suspendă 10 g agaroză în 35 ml soluţie NaOH 10 N răcită la 0°C şi se tratează, conform brevetului românesc nr. 54 342 (1), cu 2,5 g acid monocloracetic dizolvat în 3 ml apă distilată. După o bună omogenizare la temperatură joasă se încălzeşte totul timp de 30 min la 70 — 75°C cu agitare. Apoi se dizolvă produsul de reacţie în 100 ml apă fierbinte, se răceşte soluţia obţinută la 60°C şi se precipită cu 300 — 350 ml etanol ce conţine 10 % acid acetic. CM-agaroza separată

sub formă de flocoane albe se izolează prin centrifugare sau filtrare şi se reprecipită o dată sau de două ori în condiţiile de mai sus. În final, CM-agaroza este tratată cu 20 ml acid acetic glacial, centrifugată, apoi suspendată în etanol, filtrată pe o pîlnie Büchner, spălată cu etanol sau acetonă pînă la îndepărtarea completă a acidului acetic şi uscată. Se obţin 10 g CM-agaroză cu un conţinut de grupări acide de aproximativ 0,5 — 0,6 mval/g substanţă uscată.

Gelul de CM-agaroză necesar pentru cromatografia în coloană a fost în prealabil perlat după indicaţiile lui Hjertén (3), folosindu-se o concentraţie de 6 %.

Extracţia proteinelor musculare s-a realizat în condiţiile arătate într-o lucrare anterioară (4), procedîndu-se în felul următor: 5—8 g de muşchi striaţi proaspăt izolaţi de la animale situate pe trepte diferite ale evoluţiei filogenetice (crap, broască, şarpe, porumbel, şobolan alb) se mojarează cu nisip de cuarţ şi se tratează cu un tampon acetat 0,01 M pH 5,5, în raport de 1 ml soluţie tampon la 1 g ţesut muscular, pentru extragerea proteinelor. După 2 ore de extracţie la 2 —4°C, în frigider, se centrifughează omogenatul timp de 30 min la 12 000 g la o centrifugă cu răcire tip K 14 (H. Janetzky). Supernatantul obţinut este folosit la analiza cromatografică.

Cromatografia pe coloană. Se folosesc coloane de 1 × 18 cm încărcate cu CM-agaroză perlată (concentraţia gelului 6 %, capacitatea de schimb 0,6 mval/g, dimensiunea perlelor de gel 30—150 mesh). Cantitatea aplicată de extract proteic a fost de 2,5 — 3 ml, în funcţie de concentraţia proteică a extractului. Eluţia a fost realizată cu un tampon acetat cu pH 5,5 (0,01 M) folosind fie un gradient de concentraţie în creştere realizat cu NaCl (molaritatea iniţială 0,01 M, cea finală 1,0 M), fie cu un gradient de concentraţie în trepte de următoarele concentraţii: 0,01; 0,1; 0,25; 0,5 şi 1,0 M realizate prin adăugarea cantităţilor corespunzătoare de NaCl în tamponul de acetat. Se culeg probe de cîte 2 ml. Viteza de eluţie a fost de 18 ml pe oră. Concentraţia proteinelor în fracţiunile cromatografice culese cu ajutorul unui colector automat de fracţiuni LKB (Suedia) a fost determinată prin spectrofotometrare la 280 nm, la un spectrofotometru Zeiss, tip VSU 2.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Gelul perlat de CM-agaroză s-a dovedit un suport convenabil şi pentru separarea proteinelor musculare sarcoplasmatice. Proprietăţile sale mecanice bune permit viteze de scurgere suficient de mari şi la aplicarea gradientului de concentraţie. Gelul perlat de CM-agaroză se contractă doar puţin cu creşterea concentraţiei eluantului în coloană şi poate fi refolosit după o prealabilă spălare şi activare.

Analizînd diagramele de eluţie obţinute prin aplicarea unui gradient de concentraţie crescîndă de la extractele proteice musculare provenite de la animale situate pe trepte diferite de evoluţie filogenetică, se constată o creştere a numărului fracţiunilor proteice pe măsură ce animalul se găseşte pe o treaptă de evoluţie mai ridicată. Astfel, în timp ce la peşte găsim net delimitate doar două fracţiuni majore şi o a treia fracţiune numai

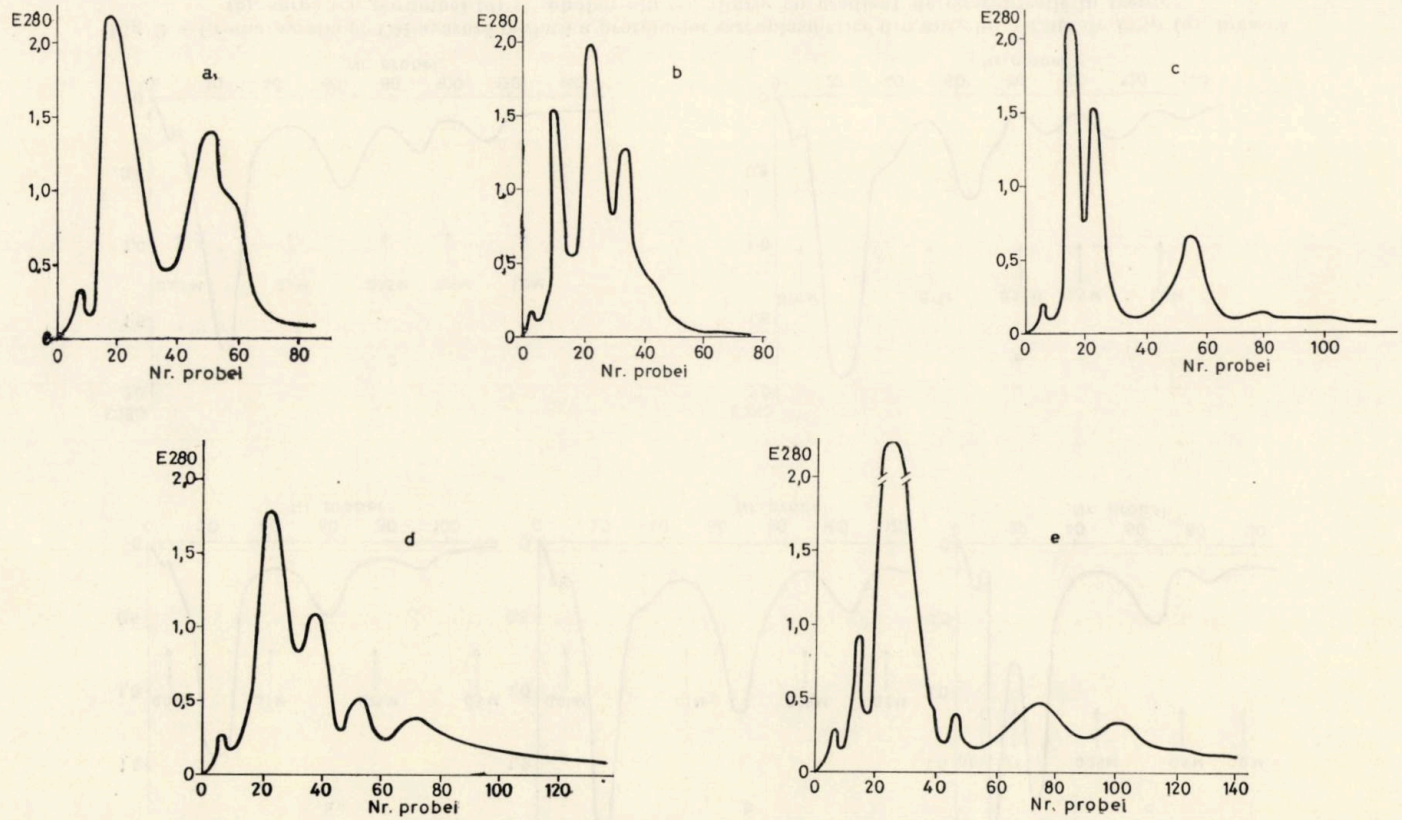


Fig. 1. — Cromatografia pe CM-agaroză perlată a proteinelor sarcoplasmatice din mușchii striați de crap (*a*), broască (*b*), șarpe (*c*), porumbel (*d*) și șobolan alb (*e*). Eluție cu gradient de concentrație cu creștere continuă.

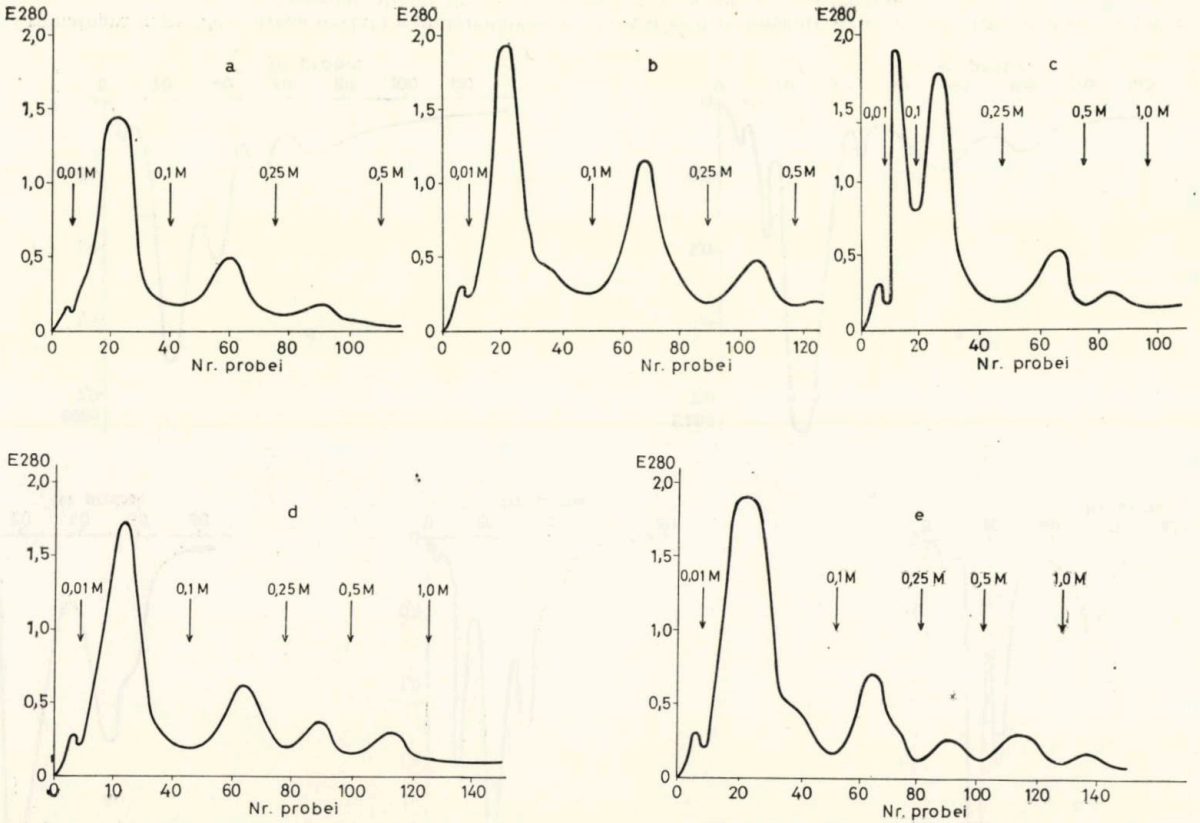


Fig. 2. — Cromatografia pe CM-agaroză perlată a proteinelor sarcoplasmatice din mușchii striați de crap (*a*), broască (*b*), șarpe (*c*), porumbel (*d*) și șobolan alb (*e*). Eluție cu gradient de concentrație în trepte.

schițată sub forma unui umăr la nivelul celei de a doua fracțiune (fig. 1*a*), la broască (fig. 1*b*) și șarpe (fig. 1*c*) se constată prezența a trei fracțiuni bine individualizate și mai net separate în cazul extractului proteic muscular de șarpe. La extractul muscular de porumbel (fig. 1*d*) numărul fracțiunilor crește la patru, iar cel obținut de la mușchii striați de șobolan alb (fig. 1*e*) chiar la cinci. La toate diagramele de eluție se mai constată prezența unui pisc mic, neînsemnat, în primele probe eluate care este însă un artefact observat de regulă și la folosirea altor schimbători de ioni. Aceste date sînt în concordanță cu cele obținute la studiul electroforetic al proteinelor musculare sarcoplasmatice de la animale situate pe trepte diferite ale evoluției filogenetice (5). Și în acest caz se observă o creștere a complexității electroforegramelor pe măsură ce înaintăm pe scara filogenetică, numărul de fracțiuni proteice dublîndu-se, de exemplu la mamifere față de cel existent la insecte. Demn de amintit cu această ocazie este și faptul că un număr crescînd de fracțiuni proteice se observă odată cu evoluția filogenetică și la studiul electroforetic al proteinelor cerebrale acvosolubile (6), (7), (8).

Pentru a obține eventual o separare mai netă între unele fracțiuni proteice, mai ales în cazul extractelor musculare de broască și șarpe, am recurs într-o a doua serie de experiențe și la o eluție în trepte. Rezultatele obținute și prezentate în figura 2 *a-e* arată în adevăr o delimitare mai bună a fracțiunilor proteice. Și în acest caz se constată o creștere a numărului de fracțiuni proteice în funcție de gradul de evoluție filogenetică al animalului studiat.

CONCLUZII

1. Carboximetil-agaroza granulată este un suport adecvat pentru separarea proteinelor musculare sarcoplasmatice prezentînd proprietăți mecanice excelente care permit viteze de scurgere optime.

2. Diagramele de eluție ale extractelor proteice din mușchii striați de vertebrate prezintă un număr crescînd de fracțiuni proteice pe măsură ce gradul de evoluție filogenetică a animalului este mai avansat.

3. Eluția cu gradient de concentrație în trepte face posibilă în cazul acestui schimbător de ion acid o separare mai netă a diferitelor fracțiuni proteice din extractele musculare față de cea cu gradient de concentrație în creștere continuă.

Prezentată la redacție la 30 octombrie 1973

Departamentul de Biochimie al Institutului de Științe Biologice București

COLUMN CHROMATOGRAPHY ON CARBOXYMETHYL-AGAROSE OF SARCOPLASMATIC PROTEINS AND THEIR EVOLUTION IN PHYLOGENY

SUMMARY

Carboxymethyl-agarose, a recently synthetized and yet little studied acid ion-exchanger of medium strength, is studied as support for the column chromatography of sarcoplasmatic proteins coming from striated muscles of some animals of different degrees of phylogenetic evolution (fish, frog, snake, bird, rat). The experimental data show excellent mechanical properties and a good resolution capacity of the beadform carboxymethyl-agarose gel. An increase in the number of protein fractions separated from the muscle extract was also found, in terms of the phylogenetic evolution degree of the animals studied.

BIBLIOGRAFIE

1. H. D. SCHELL, V. GHEŢIE, Brevet românesc Nr. 54 342 din 28.9.1968.
2. V. GHEŢIE, H. D. SCHELL, L. BUZILA, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **350**, 1675 (1969).
3. S. HJERTÉN, Biochim. Biophys. Acta, **79**, 393 (1964).
4. H. D. SCHELL. M. CÂRSTEANU, St. cerc. biochim., **15**, 211 (1972).
5. H. D. SCHELL, St. cerc. biochim., **13**, 183 (1970).
6. G. HOFFMANN, H. SCHINKO, Klin. Wchschr., **34**, 86 (1956).
7. M. ŞERBAN, St. cerc. biochim. **2**, 309 (1959).
8. H. D. SCHELL, T. BENŢIA, St. cerc. biochim., **16**, 61 (1973).

ST. CERC. BIOCHIM., 17, 1, 77—81 (1974)

VARIAȚIA CONȚINUTULUI DE FLAVONE ÎN FRUNZELE DE *VACCINIUM VITIS-IDAEA* L. ȘI *V. MYRTILLUS* L., ÎN FUNCȚIE DE GRADUL DE ILUMINARE

M. TĂMAȘ

Rezumat. — S-a determinat, prin metoda fotocolorimetrică, conținutul de flavone din frunzele de lumină și de umbră ale speciilor *Vaccinium vitis-idaea* L. și *V. myrtillus* L. iar rezultatele s-au raportat la suprafața și greutatea frunzelor uscate. Frunzele de lumină conțin o cantitate mai mare de flavone decît frunzele de umbră. Diferența este mai mare cînd se compară unitatea de suprafață și mai mică în cazul cînd conținutul de flavone se raportează la greutatea frunzelor.
Se presupune că un conținut mai ridicat de flavone în frunzele de lumină se datorește unei mai puternice iluminări.

Flavonoidele sînt pigmenți galbeni ai plantelor (antoxantine) răspîndiți în flori, frunze, fructe și alte organe pe care le colorează în galben. Ele sînt localizate în vacuolă, de cele mai multe ori sub formă glicozidată [1].

În legătură cu semnificația compușilor flavonici în metabolismul organelor vegetative ale plantelor, au fost enunțate cele mai diverse opinii. Împreună cu antocianii și catechinele formează un sistem oxidoreducător necesar proceselor metabolice ale celulei vegetale. Există și o relație între derivații flavonici și respirația celulară a plantelor prevăzute cu peroxidaze [1] — [3].

Despre influența luminii se știe că aceasta are un efect favorabil asupra apariției și formării antocianilor. Shibata (citat după [2]) consideră că o cantitate mai mare de antociani și flavone la plantele alpine se datorește unei mai mari insolații și unei temperaturi mai scăzute în timpul nopții. Proprietățile lor optice au generat ipoteza „filtrului de lumină", care a fost acceptată de către specialiștii interesați în ecologia plantelor. Din acest punct de vedere, una din funcțiile compușilor flavonici este protecția clorofilei de o insolație prea puternică și dăunătoare, în special a razelor ultraviolete [2]. Un rol de protecție față de lumină poate fi atribuit pigmenților flavonici numai atunci cînd aceștia sînt prezenți în epiderma superioară.

Pînă în prezent nu a fost studiată distribuția flavonelor în funcție de suprafața iluminată. Dacă acceptăm că un conținut mai ridicat de flavone se datorește unei mai mari intensități a luminii, atunci acest conținut va trebui raportat la unitatea de suprafață iluminată.

În frunzele de *Vaccinium vitis-idaea*, Kaminska [4] a identificat trei glicozide flavonice și a fost determinat un conținut de 0,93 % flavonoide totale [5]. În frunzele de *V. myrtillus*, Ice și Wender (6) au identificat cinci glicozide ale quercetolului.

Pentru a preciza influența luminii asupra conținutului de flavone din frunze, am urmărit repartizarea acestora în funcție de unitatea de suprafață a frunzei iluminate și raportat la greutatea frunzelor.

Pentru aceasta trebuiau alese specii care să prezinte o mare amplitudine ecologică din punctul de vedere al regimului de lumină. Acestor cerințe le răspund foarte bine speciile *V. vitis-idaea* și *V. myrtillus*, din fam. *Ericaceae*, care se dezvoltă bine atît în condiții de lumină cît și de umbră.

MATERIAL ȘI METODĂ

Frunzele de *V. vitis-idaea* și *V. myrtillus* au fost recoltate din stațiunea Băișoara (jud. Cluj) la o altitudine de cca. 1385 m în zilele de 2 și 3 august, pe timp senin. Pentru frunze de umbră am ales plantele ce creșteau în interiorul pădurii de molid (*Piceetum-Vaccinetum*), iar ca frunze de lumină, plantele ce creșteau în expoziție deschisă, pe o pantă cu înclinație sudică de circa 30°, într-o asociație de *Calluna vulgaris* și *Bruckenthalia spiculifolia*.

Ca deosebiri morfologice, se constată că plantele de umbră prezintă, în cazul ambelor specii, frunze cu limbul avînd o suprafață mare, sînt subțiri și au o culoare verde închisă, pe cînd frunzele plantelor de lumină sînt mult mai mici, de culoare verde-gălbue și mai groase. Suprafața medie a frunzelor de lumină în cazul speciei *V. vitis-idaea* este de 0,8340 cm^2, iar a celor de umbră de 1,7468 cm^2. La specia *V. myrtillus* frunzele de lumină au o suprafață medie de 0,9493 cm^2 iar cele de umbră 2,3083 cm^2.

Frunzele detașate de pe tulpini au fost supuse imediat unei presări ușoare între sugative, pentru o uscare cît mai uniformă și rapidă și, în vederea obținerii unor frunze cu limbul plan, pentru a putea determina suprafața lor.

Urmînd să verificăm conținutul de flavone, raportat la suprafața frunzelor, am folosit hîrtie milimetrică, pe care am trasat un careu de 10 × 10 cm și pe care am aplicat frunze una lîngă alta în așa fel ca să rămînă cît mai puțină suprafață de hîrtie neacoperită de frunze, milimetrii neacoperiți i-am marcat cu tuș și au fost scăzuți din suprafața de 100 cm^2 (tab. 1). Aceleași frunze, din fiecare careu separat au fost numerotate și cîntărite la balanța analitică. Pentru fiecare tip de frunze am efectuat cîte trei probe, la fiecare, indicînd suprafața și greutatea frunzelor (tab. 2).

Frunzele au fost măcinate separat și flavonele au fost extrase cu alcool etilic de 96°, în baloane Erlenmayer de 50 ml, pe baia de apă în fierbere, timp de 15 min. După filtrare soluția a fost adusă la semn, cu alcool etilic, într-un balon cotat de 25 ml.

Am dozat numai glicozidele flavonice, care au fost separate prin cromatografie preparativă pe hîrtie, din lucrările anterioare [7] constatînd că ele reprezintă majoritatea flavonoidelor din frunzele celor două specii și că prin această metodă se obțin cele mai exacte rezultate. Am utilizat

hîrtie Whatman nr. 4, de 20 × 25 cm pe care am aplicat 1 ml din soluția extractivă, folosind sistemul de solvenți dat de Grigorescu [8], care are avantajul de a elua toate glicozidele flavonice într-un singur spot. După identificarea lor în lumină UV, cu amoniac [9], [10], zonele corespunză-

Tabela 1

Conținutul de flavone în frunzele de Vaccinium vitis-idaea și V. myrtillus, în funcție de gradul de iluminare și raportat la suprafața și greutatea frunzelor uscate (în g rutozid)

Proba	Suprafața studiată		conținut/ 1 cm²	Greutatea studiată		conținut/ 1 g
	cm²	conținut de flavone		g	conținut de flavone	
Vaccinium vitis-idaea frunze de lumină						
1.1.	84,68	0,02425	0,00028	1,1850	0,02425	0,02046
1.2.	92,00	0,02675	0,00029	1,4030	0,02675	0,01906
1.3.	91,55	0,03000	0,00032	1,4000	0,03000	0,02142
frunze de umbră						
2.1.	88,78	0,01250	0,00014	1,0810	0,01250	0,01156
2.2.	93,66	0,01887	0,00012	1,1800	0,01187	0,01006
2.3.	90,46	0,01250	0,00013	1,1630	0,01250	0,01074
Vaccinium myrtillus frunze de lumină						
3.1.	91,96	0,01950	0,00020	0,6600	0,01950	0,02954
3.2.	91,32	0,02187	0,00023	0,6620	0,02187	0,03304
3.3.	91,57	0,02062	0,00022	0,7250	0,02062	0,02844
frunze de umbră						
4.1.	90,70	0,00450	0,000049	0,3700	0,00450	0,01216
4.2.	90,96	0,00470	0,000051	0,3670	0,00470	0,01008
4.3.	87,81	0,00375	0,000042	0,3524	0,00375	0,01064

Tabela 2

Compararea conținutului mediu de flavone din frunzele de Vaccinium vitis-idaea și V. myrtillus în funcție de gradul de iluminare și raportat la suprafața și greutatea frunzelor uscate (exprimate în g rutozid).

U/M	*V. vitis-idaea*			*V. myrtillus*		
	frunze de lumină (L)	frunze de umbră (U)	Raport L/U	frunze de lumină (L)	frunze de umbră (U)	Raport L/U
Suprafața (1 cm²)	0,00030	0,00013	2,23168	0,00022	0,000047	4,63257
Greutate (1 g)	0,02031	0,01079	1,88290	0,03034	0,010961	2,76834

toare flavonelor au fost decupate, mărunțite și apoi extrase cu metanol, la cald, pe baia de apă.

Pentru dozare am folosit metoda fotocolorimetrică cu $AlCl_3$, după F.R. VIII [11]. Dozarea am efectuat-o la fotocolorimetrul Lange, cu filtrul

albastru, față de o curbă etalon construită cu ajutorul unei soluții de rutozid 0,01 % în metanol, astfel că rezultatele obținute reprezintă glicozidele flavonice exprimate în rutozid.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Din analiza rezultatelor determinărilor cantitative ale flavonelor prezentate în tabelele 1 și 2, se pot constata diferențe în ceea ce privește conținutul de flavone din frunzele aceleiași specii, în funcție de gradul de iluminare. Întotdeauna frunzele de lumină conțin o cantitate mai mare de flavone decît frunzele de umbră. Dar raportul dintre conținutul în flavone al celor două tipuri de frunze diferă în funcție de unitatea la care se raportează acest conținut.

Astfel, raportat la unitatea de suprafață a frunzelor, în cazul speciei *V. myrtillus* frunzele de lumină conțin de 4,63 ori mai multe flavone decît cele de umbră, iar în cazul speciei *V. vitis-idaea* raportul este 2,23.

În funcție de greutatea frunzelor, raportul dintre conținutul de flavone al frunzelor de lumină și al celor de umbră este mai mic decît cel calculat pentru unitatea de suprafață a frunzelor : 2,76 la *V. myrtillus* și 1,88 la *V. vitis-idaea*. Aceasta se poate explica prin aceea că frunzele de umbră sînt mai subțiri, deci și mai ușoare decît cele de lumină (tab. 1 și 2) și, astfel, la unitate de greutate va corespunde un număr mai mare de frunze de umbră decît în cazul comparării unității de suprafață. Această diferență de greutate este mai pronunțată în cazul speciei *V. myrtillus*.

Din analiza rezultatelor se poate aprecia că diferența cea mai mare în privința conținutului de flavone al frunzelor de lumină și de umbră, în cazul speciilor studiate, este aceea care se raportează la suprafața frunzelor.

Aceste rezultate sprijină ipoteza că un conținut mai ridicat de flavone este determinat de intensitatea iluminării.

CONCLUZII

1. În cazul speciilor *Vaccinium vitis-idaea* și *V. myrtillus*, frunzele de lumină conțin o cantitate mai mare de flavone decît frunzele de umbră.

2. Diferența dintre conținutul de flavone al frunzelor de lumină și celor de umbră este mai mare cînd raportarea se face la suprafața frunzelor și mai mică dacă raportatea se face la greutatea frunzelor.

3. Se poate aprecia că, în cazul speciilor studiate, conținutul mai ridicat de flavone a frunzelor de lumină se datorește unei intensități mai mari a iluminării.

Prezentat la redacție la 1 octombrie 1973 *Disciplina de Botanică farmaceutică, Facultatea de Farmacie, Cluj.*

VARIATION OF THE FLAVONOIDS CONTENT IN THE LEAVES OF *VACCINIUM VITIS-IDAEA* L. AND *V. MYRTILLUS* L. IN ACCORDANCE WITH THEIR DEGREE OF ILLUMINATION

SUMMARY

The flavonoids content in sunny side and shady side leaves of *Vaccinium vitis-idaea* and *V. myrtillus* was analysed by the photocolorimetric method and the results were referred to the area and weight of the leaves.

The sunny side leaves contain a greater quantity of flavonoids than the shady side leaves. The ratio is greater if the areas of the leaves are compared, and smaller for the weight of the leaves.

BIBLIOGRAFIE

1. Em. Grigorescu, *Curs de farmacognozie*, vol. I. Iași, 1969 (litografia IMF Iași).
2. F. Blank, *Antocyanins, flavones, xanthones*, în RUHLAND W.: *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Bd. X, Springer Verlag, Berlin—Heidelberg—Göttingen, 1958.
3. H. W. Sigelman, *Physiological studies on phenolic biosynthesis*, în J. B. Harborne, *Biochemistry of phenolic compounds*, Acad. Press, London—New York, 1964, p. 437—456.
4. J. Kaminska, Diss. Pharm. Pharmacol., **18**, 267 (1966).
5. J. Kaminska, H. Maraszek-Truszcinska, Farm. Polska, **23**, 440 (1967).
6. C. H. Ice, S. H. Wender, J. Amer. Chem. Soc., **75**, 50 (1953).
7. M. Tamaș, Farmacia, **21**, 299 (1973).
8. Em. Grigorescu, Farmacia, **10**, 353 (1962).
9. T. A. Geissman, *The chemistry of flavonoids compounds*, Pergamon Press, Oxford—London—New York—Paris, 1962.
10. J. T. Mabry, K. R. Markham, M. B. Thomas, *The systematic identification of flavonoids*, Springer Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1970.
11. * * * *Farmacopeea Română*, ed. VIII, Edit. Medicală, București 1965, p, 287.

ST. CERC. BIOCHIM., 17, 1, 83-96 (1974)

REFERAT GENERAL

CATABOLIZAREA IMUNOGLOBULINELOR

VICTOR GHEȚIE

1. STRUCTURA, BIOSINTEZA ȘI CATABOLIZAREA IMUNOGLOBULINELOR

Imunoglobulinele (Ig) sînt un grup de glicoproteine serice investite cu funcții imunologice în organismul vertebratelor.

Structura lor chimică s-a bucurat de atenția chimiștilor mai ales în ultimii 15 ani și de aceea în momentul de față dispunem de o „colecție" de modele spațiale bazate atît pe cunoașterea integrală a secvenței unor subclase (de ex. IgG și IgM) cît și pe analiza roentgenografică a unor fragmente cristalizabile (de ex. fragmentul Fc). Unul dintre aceste modele, care a acreditat structura discretă în „domenii" a IgG este prezentat în figura 1.

Biosinteza Ig și în particular a anticorpilor aparținînd claselor IgG și IgM a fost, de asemenea, minuțios investigată în ultimul deceniu. De

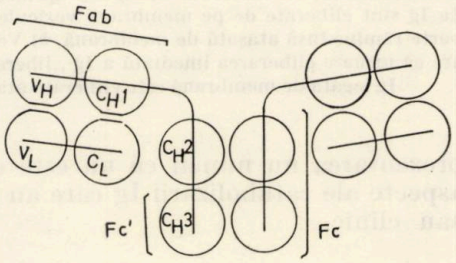


Fig. 1. — Structura în domenii a IgG (după Edelman [1]). Cu *V* s-au notat regiunile cu secvență variabilă iar cu *C* regiunile cu secvență constantă ale lanțurilor ușoare (*L*) și grele (*H*). Fragmentul Fab este alcătuit din domeniile V_HC_H1 și V_LC_L unite printr-o punte disulfitică plasată între C_H1 și C_L. Fragmentul Fc este format din domeniile C_H2 și C_H3 iar Fc' din domeniul C_H3, în principal. Regiunea balama a moleculei de IgG, distrusă în general de enzimele proteolitice, nu este structurată într-un domeniu ci cuprinde porțiunea de lanț polipeptidic H dintre domeniile C_H1 și C_H2.

aceea se cunoaște ceea ce este particular în sinteza acestor proteine (formarea lanțurilor polipeptidice, asamblarea moleculelor de IgG precum și secreția lor). O schemă a modului în care decurge transportul intracelular și secreția Ig în celulele limfoide este prezentată în figura 2.

O atenție considerabil mai mică s-a acordat problemei catabolizării Ig în organismul intact și în țesuturi și în celule izolate. Concepția turnoverului constant al proteinelor, în general, și al imunoglobulinelor, în special, introdusă încă din 1922 de Glenny și Hopkins a așteptat utilizarea radioizotopilor (1951) pentru a putea fi verificată și mai ales extinsă. Chiar și după ce tehnicile de studiere a catabolizării proteinelor au fost puse la punct doar un număr relativ mic de cercetări au fost întreprinse în domeniul imunoglobulinelor. În consecință analiza cunoștințelor dobîndite,efectuată acum cîțiva ani de Waldmann și Strober [3], raporta mai puțin de 400 contribuții, cifră mult inferioară publicațiilor destinate structurii sau biosintezei anticorpilor. De aceea prezentul referat reflectă, cel puțin în anumite direcții analizate, sărăcia faptelor experimentale și lipsa de

siguranță a unor concluzii. Totuși, confruntarea rezultatelor obținute de diferiți autori permite unele concluzii care pot fi integrate cu folos în cunoștințele noastre generale asupra structurii și metabolismului Ig. De o atenție deosebită s-au bucurat, în acest referat, unele aspecte care au fost timp de mai mulți ani în atenția noastră și de aceea, în mod firesc,

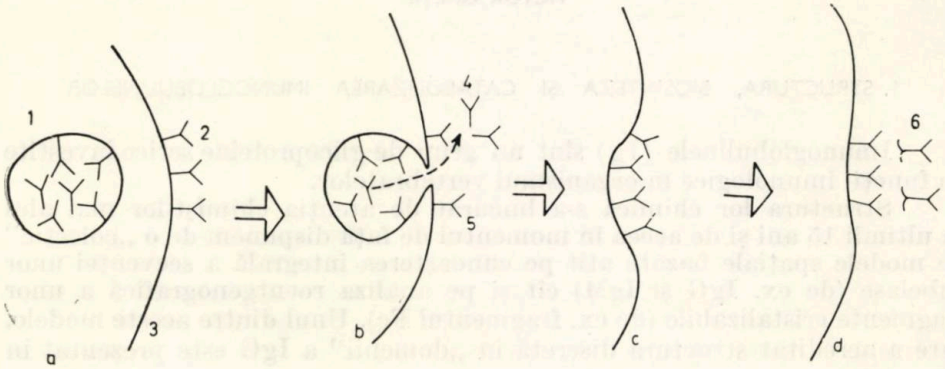


Fig. 2. — Transportul intracelular și secreția Ig (după Uhr și Vitetta [2]). *1*) complex Golgi; *2*) Ig receptor; *3*) membrana celulară; *4*) Ig liberă; *5*) Ig legată de membrana celulară; *6*) Ig cu fragmente de membrană. *a*) Ig sintetizate pe poliribozomi sînt transportate la complexul Golgi unde se prind de membrana internă prin intermediul regiunii Fc. Aici are loc incorporarea carbohidraților în molecula de Ig cu ajutorul glicozil-transferazelor. Majoritatea moleculelor de Ig sînt eliberate de pe membrana veziculelor Golgi și se găsesc libere în vezicule; o mică parte rămîne însă atașată de membrană. *b*) Vezicula se contopește cu membrana celulei ceea ce are ca urmare eliberarea imediată a Ig „libere" și exteriorizarea Ig legate de membrană. *c* și *d*) Ig legată de membrană este eliberată atașată, probabil, de fragmente de membrană.

prezentarea nu numai că nu este exhaustivă dar a eliminat, voit, acele aspecte ale catabolizării Ig care au fost abordate sub aspect pur fiziologic sau clinic.

2. EVALUAREA CATABOLIZĂRII IMUNOGLOBULINELOR

a. Marcarea cu izotopi radioactivi

Catabolizarea imunoglobulinelor este urmărită cu ajutorul Ig radioactive. Cei mai folosiți radionuclizi sînt ^{131}I și ^{125}I cu un timp de înjumătățire de 8, respectiv 57 de zile. Radioiodul este introdus în molecula Ig (în nucleul aromatic al tirozinei) cu ajutorul unor agenți oxidanți adecvați (de ex, lactoperoxidaza [4]) capabili de a realiza radioiodurarea fără a altera semnificativ structura nativă a Ig. Ig radioactivă trebuie să fie identică din punct de vedere structural și metabolic cu Ig nativă pentru a putea considera că scăderea radioactivității în sînge măsoară catabolizarea reală a acestor proteine. Din acest motiv, o atenție deosebită trebuie acordată nu numai felului în care se face radioiodurarea Ig dar și modului în care se realizează izolarea, purificarea și păstrarea ei [5].

b. Timpul de înjumătățire și rata fracțională de catabolizare

Procesul de distrugere a Ig este o reacție de ordinul întîi, în care cantitatea de Ig distrusă (dIg) într-un interval dat de timp (dt) este direct proporțională cu concentrația Ig prezente (Ig). Această relație poate fi scrisă astfel :

$$\frac{dIg}{dt} = K\ Ig \qquad (1)$$

în care K = rata fracțională de catabolizare a Ig, adică fracțiunea din Ig totală intravasculară catabolizată în unitatea de timp (de obicei pe zi). Integrarea și rezolvarea ecuației de mai sus dau expresia :

$$t = \frac{1}{K} \ln \frac{(Ig_0)}{(Ig_t)} \qquad (2)$$

unde (Ig_t) este cantitatea de Ig rămasă necatabolizată, iar (Ig_0) reprezintă cantitatea de Ig inițială.

Notînd timpul la care cantitatea de Ig inițială (Ig_0) s-a redus la jumătate ($Ig_t = Ig_0/2$) cu T 1/2 (timp de înjumătățire) și introducînd aceste condiții în ecuația de mai sus, se obține :

$$T\ 1/2 = \frac{1}{K} \ln \frac{(Ig_0)}{(Ig_0/2)} = \frac{\ln 2}{K}\ ;\ T\ 1/2 = \frac{0{,}693}{K} \qquad (3)$$

Din ecuația (3) rezultă că timpul de înjumătățire (T 1/2) a unei Ig este cu atît mai lung cu cît rata sa fracțională de catabolizare este mai mică. Pentru a calcula deci rata fracțională de catabolizare (K) a Ig este suficient să se determine timpul ei de înjumătățire (T 1/2), operație care se realizează măsurînd scăderea radioactivității în sînge a Ig radioactive administrate, în funcție de timp (fig. 3).

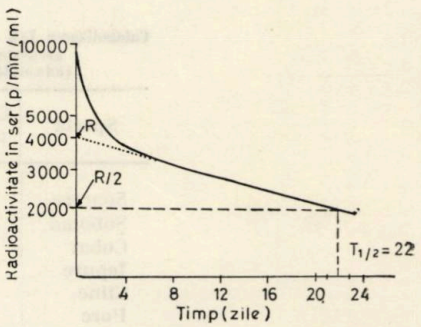


Fig. 3. — Scăderea radioactivității serului sanguin în funcție de timp în urma administrării intravenoase de ^{125}I—IgG umană la un om normal. S-a extrapolat porțiunea dreaptă pînă la intersecția ordonatei (R = 4 000). S-a împărțit valoarea găsită la 2 ($R/2$ = 2000) și din acest punct s-a dus o dreaptă paralelă cu abscisa pînă la intersecția curbei exponențiale în punctul corespunzător valorii 22 zile pe axa timpului (T ½). Ordonata este în scară logaritmică.

Scăderea radioactivității se face după o curbă exponențială caracteristică unei reacții de ordinul întîi. Se extrapolează porțiunea dreaptă a curbei (linia punctată din figură) la timpul zero și apoi se determină timpul (T 1/2) care corespunde la jumătate din valoarea găsită prin extra-

polare (linia întreruptă din figură). Se găsește că T 1/2 al IgG la individul urmărit este de 22 zile. Din ecuația (3) se calculează apoi rata fracțională de catabolizare a IgG umane, în cazul cercetat.

c. Catabolizarea claselor de imunoglobuline

Timpul de înjumătățire (T 1/2) și rata fracțională de catabolizare (K) a celor cinci clase de Ig sînt prezentate în tabela 1. Se observă că, concentrația Ig în ser este dependentă de raportul dintre rata lor fracțională de catabolizare și rata de sinteză.

Tabela 1

Catabolizarea imunoglobulinelor umane (după Waldman [3])

Clasa	Conc. în ser (mg/ml)	T ½ (zile)	Rata fracțională de catabolizare *	Rata de sinteză (mg/kg/zi)
IgG	11,3—12,6	18—23	5,8—6,9	28—36
IgM	0,78—0,93	5,1	1,10—1,87	4,5—6,9
IgA	2,5	5,0—6,5	2,52	24—30
IgD	0,023	2,8	3,7	0,4

* Exprimarea ratei de catabolizare s-a făcut procentual considerînd că pentru K = 1 (ecuația (3)) întreaga cantitate de Ig este catabolizată (100%).

Există diferențe și între rata fracțională de catabolizare a subclaselor. Astfel IgG1, IgG2 și IgG4 au rate de catabolizare similare (7 % din cantitatea lor totală intravasculară este catabolizată pe zi) în timp ce IgG3 are o rată de catabolizare mult mai mare (17 %) [6], [7].

3. FACTORI CARE CONTROLEAZĂ CATABOLIZAREA IMUNOGLOBULINELOR

Rata catabolizării Ig este determinată de metabolismul organismului. S-au găsit diferențe importante între timpul de înjumătățire al IgG la diferite specii, el fiind cu atît mai lung cu cît greutatea corporală a animalului este mai mare (tabela 2). Hipermetabolismul asociat cu febră sau

Tabela 2

Catabolizarea IgG în animale adulte în funcție de greutatea lor corporală medie (adaptată după Waldman [3]).

Specia	Greut. corp. medie (Kg)	Timp de înjum. (T ½) (zile)
Șoarece	0,025	3,9
Șobolan	0,3	5,0
Cobai	0,5	5,5
Iepure	3,0	6,7
Cîine	10,0	8,0
Porc	50,0	10,7

administrare de tiroxină produce o scurtare a timpului de înjumătățire a IgG și, deci, creșterea ratei fracționale de catabolizare.

Același efect a fost constatat și prin administrarea corticosteroizilor [8].

Un factor fiziologic important care controlează catabolizarea IgG este concentrația lor în ser. Rata fracțională de catabolizare a IgG variază direct proporțional cu concentrația acestora în ser. Această dependență este ilustrată în figura 4.

Persistența IgG este mult prelungită la pacienți care au o concentrație scăzută a IgG serice (T 1/2 pînă la 70 zile) și este micșorată pînă la T 1/2 = 1.2 zile la cei cu o concentrație de IgG în jur de 30 mg/ml [8].

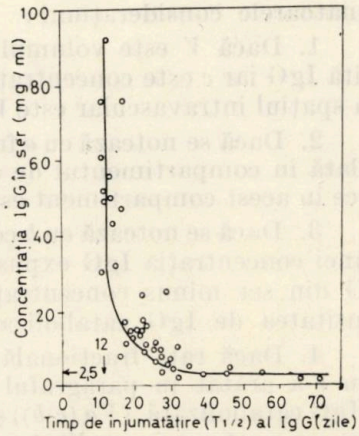


Fig. 4. — Corelația dintre timpul de înjumătățire (T 1/2) al IgG umane și concentrația IgG în ser (după Waldmann [3]). Datele au fost obținute prin studierea T 1/2 la pacienți cu concentrații de IgG foarte diferite. T 1/2 pentru cea mai mare concentrație de IgG a fost de 12 zile. Concentrația proteică pentru care T 1/2 devine infinit de mare este de 2,5mg/ml.

Aceeași dependență a catabolismului de concentrație a fost găsită și la subclasele de IgG umană precum și la IgG de iepure și de șoarece [3]. Pentru IgM și IgA s-a constatat că rata fracțională de catabolizare este independentă de concentrația lor în ser. Rata fracțională de catabolizare a IgD este invers proporțională cu concentrația sa în ser, fiind deci joasă la pacienții cu concentrații ridicate de IgD [3].

4. MECANISMUL CATABOLIZĂRII IMUNOGLOBULINELOR

Pentru a explica dependența catabolizării IgG de concentrația sa în ser s-a formulat o ipoteză generală asupra mecanismului acestei catabolizări [9].

Ipoteza susține că o parte din moleculele de IgG pot să treacă din spațiul intravascular într-un compartiment de „catabolizare" în care există celule capabile să le capteze prin pinocitoză. Pe suprafața acestor celule există un număr limitat de receptori capabili să atașeze specific IgG. De aceea, în celulele catabolizatoare vor fi incorporate (în vezicule micropinocitare) atît molecule de IgG fixate de receptori cît și molecule fără receptori. Moleculele de IgG fixate de receptori sînt protejate contra degradării și pot, în cele din urmă, părăsi celula revenind intacte în circulație, în timp ce, moleculele care au fost incorporate fără receptori sînt degradate (probabil de catepsinele sistemului lizozomal).

La concentrații scăzute de IgG în ser, majoritatea moleculelor sînt incorporate în celule asociate cu receptori protectori (numărul de molecule $\leqslant$ $\leqslant$ numărul de receptori) și astfel se întorc intacte în circulație. De aceea în aceste cazuri se determină T 1/2 mari.

Deoarece numărul de receptori protectori este limitat, la concentrații ridicate de IgG numai o mică proporție din molecule (egală cu numărul de receptori) este protejată în timp ce restul este degradat determinînd o scurtare a timpului de înjumătățire.

Brambell și colab. [9] au dat modelului de catabolizare propus de ei o exprimare matematică ce a corespuns foarte bine cu datele experimentale, fapt care a contribuit mult la acreditarea ipotezei lor.

Demonstrarea matematică a modelului de catabolizare pornește de la următoarele considerațiuni :

1. Dacă V este volumul spațiului intravascular în care este distribuită IgG iar c este concentrația sa în ser, atunci cantitatea totală de IgG din spațiul intravascular este Vc.

2. Dacă se notează cu a fracțiunea din volumul intravascular care este izolată în compartimentul de catabolizare, atunci cantitatea de IgG care trece în acest compartiment este dată de relația Vac.

3. Dacă se notează cu b concentrația de IgG care saturează receptorii, atunci concentrația IgG expuse catabolizării va fi c-b, adică concentrația IgG din ser minus concentrația necesară pentru saturarea receptorilor. Cantitatea de IgG catabolizată va fi exprimată prin relația $Va\ (c\text{-}b)$.

4. Dacă rata fracțională de catabolizare a IgG (K) este egală, așa cum s-a arătat în paragraful precedent, cu raportul dintre cantitatea de IgG catabolizată ($Va\ (c\text{-}b)$) și cantitatea de IgG din spațiul intravascular (Vc), se poate scrie egalitatea :

$$K = \frac{Va\ (c - b)}{Vc} = \frac{a\ (c - b)}{c}. \tag{4}$$

Dacă în ecuația de mai sus K se substituie prin $0{,}693/T\ 1/2$ (vezi (3)), ea devine :

$$T\ 1/2 = \frac{0{,}693\ c}{a\ (c - b)}. \tag{5}$$

Valoarea a se determină punînd condiția limită că c este foarte mare în raport cu b ($c \to \infty$) și de aceea acesta din urmă se poate neglija ($b = 0$).

$$T\ 1/2 = \frac{0{,}693}{a}; \qquad a = \frac{0{,}693}{T1/2}. \tag{6}$$

Din curba reprezentată în figura 4 se obține valoarea lui a dacă împărțim pe 0,693 la $T\ 1/2$ găsit pentru cea mai mare concentrație proteică ($T\ 1/2$ aprox. 12 zile). $a = 0{,}693/12 = 0{,}06$.

Valoarea b se determină aranjînd ecuația (5) sub forma :

$$b = c\left(1 - \frac{0{,}693}{a\ T1/2}\right) \tag{7}$$

şi punînd condiţia că $T\,1/2$ tinde spre infinit ($T\,1/2 \to \infty$). Raportul $0{,}693/a\ T\,1/2$ se anulează şi b devine egal cu c ($b = c$).

Din curba reprezentată în figura 4 se calculează b găsind valoarea concentraţiei de IgG (c) pentru cazul în care $T\,1/2$ devine infinit de mare. Se observă că asimptota spre care tinde c cînd $T\,1/2$ devine infinit de mare intersectează ordonata la o valoare de aproximativ 2,5 mg/ml (deci, $b = 2{,}5$).

Înlocuind pe a şi b în ecuaţia (5) aceasta devine :

$$T\,1/2 = \frac{0{,}693\,c}{0{,}06\,c - 0{,}15}. \qquad (8)$$

Reprezentarea grafică a ecuaţiei (8) dă o curbă exponenţială care se suprapune mulţumitor peste cea determinată experimental (în figura 4).

Ipoteza prezentată înainte explică şi mecanismul transportului transplacentar şi transintestinal neonatal, a IgG [10].

S-a arătat că o cantitate apreciabilă din IgG radioactivă administrată intraduodenal la şobolanii nou născuţi este transportată peste pereţii intestinali în circulaţia animalelor [8]. În omogenatele obţinute din mucoasa intestinală a fost pusă în evidenţă IgG cu o greutate moleculară mare, datorită asocierii ei cu fracţiuni din membrana celulară. S-a presupus că IgG se ataşează pe receptorii de pe membrana enterocitelor. Membrana se invaginează şi formează o veziculă micropinocitară ce migrează pînă la baza celulei şi eliberează IgG intactă în circulaţie. O schemă a acestui proces ce operează atit la transmiterea transcelulară a IgG cît şi la cataboliza ei este prezentată în figura 5.

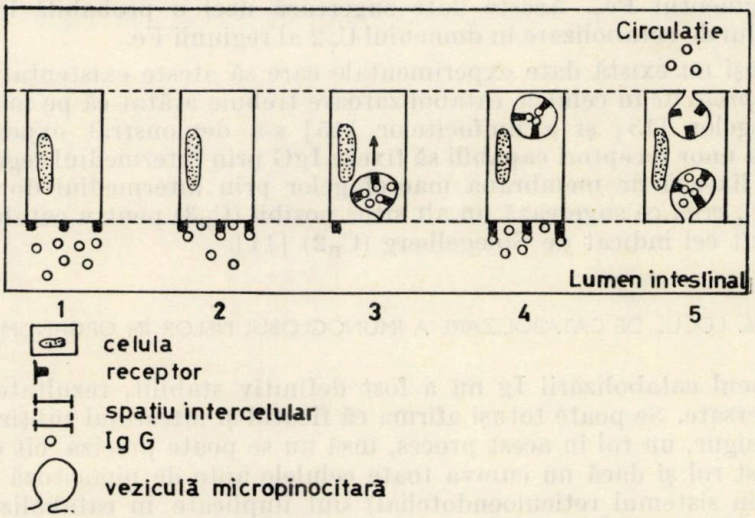


Fig. 5. — Schema transportului transcelular şi catabolizării IgG reprezentată după mecanismul propus de Brambell [9]. *1*) Situaţia iniţială; *2*) fixarea IgG de suprafaţa celulei; *3*) distrugerea în veziculele micropinocitare a IgG nefixată de receptori; *4*) migrarea veziculei la polul opus al celulei (în cazul transportului); conservarea IgG fixată de receptori; *5*) eliberarea IgG de pe receptori în circulaţie şi fixarea unor noi molecule de suprafaţa celulei.

5. LOCALIZAREA SITUSULUI DE CATABOLIZARE ÎN MOLECULA IMUNOGLOBULINELOR

Timpul de înjumătățire al fragmentelor Fab, F (ab')$_2$ și Fc provenite din scindarea cu papaină sau pepsină a IgG a arătat că ele sînt catabolizate cu o viteză mult diferită. Catabolismul fragmentelor Fc din IgG este similar catabolismului moleculei intacte de IgG. Astfel Fc_γ are un T 1/2 de cel puțin jumătate din cel al IgG intacte și de 50 ori mai lung decît cel al fragmentelor Fab_γ sau al lanțului L [11], [3]. Administrarea intravenoasă a Fc_γ sau IgG intacte scurtează timpul de înjumătățire al IgG radioactive intacte, în timp ce fragmentele Fab_γ sau lanțul L nu au această proprietate. De asemenea, IgG și Fc_γ sînt transportate preferențial peste mucoasa intestinală a rozătoarelor nou născute, în timp ce Fab_γ și lanțul L nu participă la acest transport transcelular [12], [8]. Fixarea IgG radioactive de suprafața macrofagelor poate fi inhibată prin administrarea prealabilă a fragmentului Fc_γ, dar nu și a fragmentului Fab_γ [13].

Datele mai sus menționate au condus în mod justificat la ideea că regiunea Fc este situsul submolecular cu cea mai mare importanță pentru metabolizarea întregii molecule.

Comparînd timpul de înjumătățire al fragmentelor Fc_γ cu cel al subclaselor de IgG umane din care provin aceste fragmente s-a observat o lipsă de corespondență care a dus la concluzia că în situsul de catabolizare al IgG poate fi implicată și o porțiune din Fc care este strict adiacentă regiunii balama [14]. Deoarece această regiune este puternic afectată în urma hidrolizei enzimatice, pare probabil ca lipsa de corespondență semnalată înainte să se datoreze distrugerii sau blocării situsului de catabolizare din fragmentul Fc_γ. Aceste date sugerează deci o probabilă localizare a situsului de catabolizare în domeniul $C_\gamma 2$ al regiunii Fc.

Deși nu există date experimentale care să ateste existența receptorilor *de protecție* în celulele catabolizatoare trebuie arătat că pe membrana macrofagelor [13] și a limfocitelor [15] s-a demonstrat experimental prezența unor receptori capabili să fixeze IgG prin intermediul regiunii Fc. IgG se fixează de membrana macrofagelor prin intermediul domeniului C_H3 [16], ceea ce sugerează un alt situs posibil (C_H3) pentru catabolizarea IgG decît cel indicat de Spiegelberg (C_H2) [14].

6. LOCUL DE CATABOLIZARE A IMUNOGLOBULINELOR ÎN ORGANISM

Locul catabolizării Ig nu a fost definitiv stabilit, rezultatele fiind controversate. Se poate totuși afirma că ficatul și intestinul subțire joacă, în mod sigur, un rol în acest proces, însă nu se poate preciza cît de mare este acest rol și dacă nu cumva toate celulele apte de pinocitoză (de ex., celule din sistemul reticuloendotelial) sînt implicate în catabolizarea Ig.

Ficatul are capacitatea de a cataboliza IgG endogenă. Acest fapt a fost demonstrat de Cohen și colab. [17] prin perfuzarea ficatului de șobolan cu IgG radioactivă. S-a putut calcula că ficatului îi revine 30 % din cantitatea totală de IgG distrusă în organism. Catabolizarea este îndeplinită de celulele hepatice parenchimatoase și mai puțin de celulele Kupffer.

Tractul gastro-intestinal a fost considerat mult timp ca fiind locul principal de catabolizare a Ig. Andersen şi colab. [18] au estimat că 38% din IgG se catabolizează la nivelul intestinului subţire. Aceste valori nu au fost confirmate ulterior de alţi autori [3] care au arătat că participarea intestinului subţire la catabolizarea IgG este mult mai modestă (maximum 15% din IgG totală). După Andersen şi colab. [18] degradarea IgG se petrece în lumenul intestinal fiind realizată de enzimele prezente la acest nivel. IgG trece din plasmă în lumen datorită unor schimbări în permeabilitatea vaselor capilare şi nu implică transportul peste celulele epiteliale din mucoasa intestinală. Această explicaţie a fost contrazisă experimental şi s-a formulat un alt punct de vedere care consideră că celulele epiteliale din mucoasa intestinală incorporează şi distrug moleculele de IgG care ajung la nivelul lor prin circulaţie [19]. S-a dovedit că celulele din mucoasa intestinală de şobolan pot să capteze, să concentreze la nivelul lizozomilor şi să degradeze o cantitate apreciabilă de IgG ajunsă la acest nivel prin perfuzia intestinului pe cale circulatorie [20]. Fenomenul este analog celui reprezentat în figura 5, cu deosebire că fixarea şi incorporarea se face la polul opus celui orientat spre lumenul intestinal. Posibilitatea ataşării IgG de receptori proveniţi din membrana lizozomală este sugerată de apariţia în omogenatele de lizozomi din mucoasa intestinală a unei IgG cu o greutate moleculară de 6 ori mai mare decît a celei iniţiale (fig. 6).

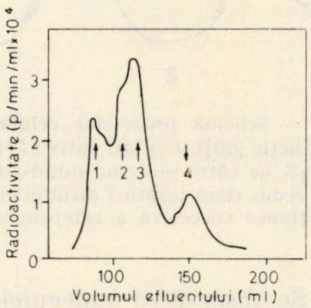


Fig. 6. — Gel filtrarea pe Sephadex G—150 a extractului cu dezoxicolat (0,3%) din lizozomii mucoasei intestinale incubaţi cu IgG radioactivă. *1*) IgG cu greutate moleculară mare (10^6); *2*) IgG agregat; *3*) IgG nativ ($1{,}5 \times 10^5$); *4*) fragmente Fab + Fc.

Rinichiul joacă un rol major în catabolizarea lanţurilor uşoare ale Ig şi ale proteinelor Bence-Jones. Aceste proteine sînt filtrate prin glomerul şi apoi sînt captate de celulele tubilor proximali, unde sînt supuse cataboliz ării [8]. La bolnavi cu proteinurie tubulară, determinată de leziuni ereditare sau dobîndite ale tubilor renali, se constată excreţia în urină a unor cantităţi mari de proteine cu greutate moleculară mică, lanţul uşor reprezentînd un procent însemnat (pînă la 80 mg/zi faţă de 1—4 mg/zi, în cazurile normale). S-a presupus că proteinuria tubulară este determinată de incapacitatea tubilor renali proximali de a capta şi cataboliza proteine serice cu greutate moleculară mică (inclusiv lanţul L), care sînt filtrate în mod normal prin glomeruli.

S-a arătat că celulele tubulare renale sînt capabile să capteze cantităţi însemnate de lanţuri uşoare, să le concentreze în sistemul lizozomal şi apoi să le degradeze limitat, pînă la fragmente de tipul jumătăţilor de lanţ (V_L sau C_L), sau complet, pînă la peptide cu greutate moleculară mică [21].

Și în cazul incubării celulelor renale [21] sau lizozomilor (22) cu lanțul L radioactiv s-a pus în evidență apariția unor polimeri care ar putea include și material din membrana plasmatică sau lizozomală.

7. EVENIMENTE INTRACELULARE CARE STAU LA BAZA DEGRADĂRII IMUNOGLOBULINELOR

Căile catabolice pe care le parcurg moleculele de Ig incorporate în celule s-au studiat pe celule intacte *in vitro*, pe fracțiuni subcelulare bogate în lizozomi [23] și cu ajutorul catepsinelor pure extrase din aceste celule [24].

Rezultatele sînt prezentate în figurile 7 și 8.

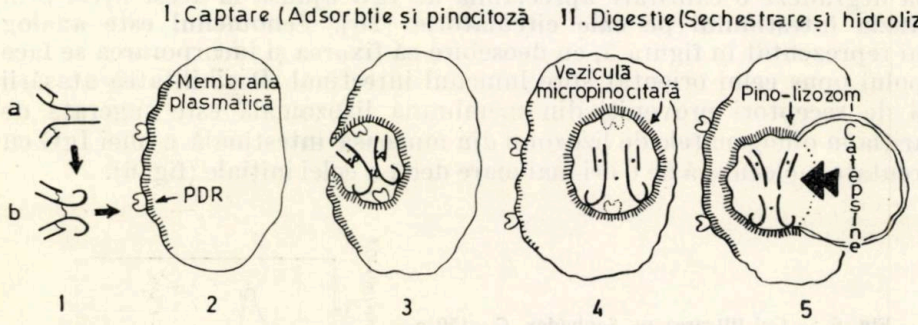


Fig. 7. — Schema proceselor celulare și moleculare care stau la baza catabolizării IgG (după Gheție [30]). *1 a*) IgG nativ ; *1 b*) IgG „modificat" ; *2*) atașarea IgG de membrană ; *3*) reducerea IgG de către proteindisulfid-reductază în vezicula micropinocitară în curs de formare ; *4*) IgG redus (fără legături disulfidice interlanț) în vezicula micropinocitară ; *5*) hidroliza IgG prin acțiunea succesivă a catepsinelor *B*, *D* și *E* în pinolizozomi ; *PDR* = proteindisulfid-reductaza.

Se observă că moleculele de IgG „modificate" se fixează, prin regiunea lor Fc, de membrana celulară și sînt incorporate în veziculele micropinocitare, într-un proces activ de adsorbție și pinocitoză. O proteindisulfid-reductază citoplasmatică ar putea reduce o parte din moleculele de IgG desfăcînd punțile disulfidice interlanț, deoarece această enzimă este capabilă să elibereze componentul secretor din molecula de IgA secretoare [26]. După fuzionarea veziculelor micropinocitare cu lizozomi primari (fig. 7, 5) catepsinele lizozomale acționează în punga pinolizozomului asupra moleculelor de IgG sechestrate aici și le scindează în succesiunea indicată în figura 8.

Fragmentele de tip Fc desprinse din moleculă pot fi scindate mai avansat , la fragmente de tip Fc', de către catepsinele B și D, iar fragmentele de tip Fc' pot fi hidrolizate pînă la peptide, mai ales de către catepsina E [27]. Aceste procese hidrolitice se petrec pe suprafața internă a membranei lizozomale de care este atașată molecula de IgG.

Fragmentele de tip Fab, cu legăturile disulfidice intacte, sînt extrem de rezistente la acțiunea catepsinelor. Prin ruperea legăturilor disulfidice se induce o susceptibilitate la atacul catepsinelor ; acestea pot desprinde

din lanțul L și fragmentul Fd subunități pe care le pot degrada pînă la peptide [28].

Cantitatea de fragment Fab nedigerată, identificată în celule, este dependentă, probabil, de cooperarea dintre sistemul reductazic și cel cateptic. Se poate presupune că o deficiență în această cooperare sau o creștere anormală a concentrației IgG serice (deci și a IgG catabolizate) ar duce la

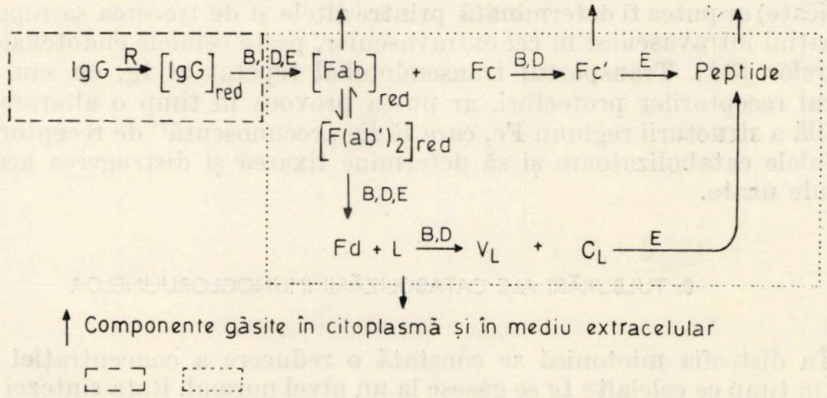


Fig. 8. — Calea biochimică de degradare a IgG în celule. *B*, *D*, *E* = catepsinele *B*, *D* și *E*; *R* = proteindisulfid-reductaza; red = redus; = veziculă micropinocitară; = lizozom.

o acumulare de Fab în celulă. O parte din acesta ar putea părăsi celula ajungînd în ser și apoi în urină. Prezența fragmentului Fab a fost semnalată în ser și urină [29], precum și în mediile de cultură a celulelor hepatice după incubarea lor cu cantități mari de IgG [30].

Schema prezentată mai sus consideră că întreaga cantitate de IgG incorporată în celule este degradată în fragmente sau peptide. Această posibilitate s-a impus în urma constatării experimentale că IgG care a suferit o tranziție de conformație este capabilă să se incorporeze în celule în cantitate de 10 ori mai mare decît IgG nativă [31]. Rezultă că de celule se pot fixa cu precădere molecule de IgG care au suferit modificări de conformație în regiunea Fc. Deoarece aceste molecule sînt mult mai susceptibile decît cele native la acțiunea enzimelor proteolitice este foarte probabil că ele nu pot scăpa de acțiunea destructivă a catepsinelor intralizozomale. Deoarece IgG poate suferi astfel de modificări conformaționale chiar în organism, ca rezultat al îmbătrînirii la nivel molecular [32], produsă de uzura metabolică a proteinei, s-a sugerat că celulele catabolizatoare reține, scot din circulație și distrug numai aceste molecule uzate [33]. Moleculele de IgG native nu sînt fixate de celule în cantități semnificative pentru procesul general catabolic al acestei proteine. De aceea nu este necesar să se postuleze existențe unor receptori protectori și nici a unui circuit intracelular care să fie parcurs fără alterări moleculare.

Această ipoteză asupra mecanismului de catabolizare [30] este contrară celei formulate de Brambell și colab. [9]. Se presupune că de

receptorii celulari se fixează molecule de Ig care au suferit în regiunea Fc o tranziție de conformație. În urma incorporării lor în celulă, Ig sînt distruse parțial sau total de către sistemul cateptic în cooperare cu cel reductazic. Rezultă că evenimentul principal care controlează catabolizarea Ig nu are loc în celulele catabolizatoare (cum presupune ipoteza lui Brambell și colab.) ci este legat de tranziția de conformație de la forma „nativă" la cea „modificată" precum și de echilibrul cantitativ care se stabilește între cele două forme. Uzura metabolică a Ig (cu formarea moleculelor modificate) ar putea fi determinată printre altele și de trecerea sa repetată din spațiul intravascular în cel extravascular, peste celulele endoteliale ale capilarelor [34]. Transportul transendotelial repetat al Ig, cu sau fără ajutorul receptorilor protectori, ar putea provoca în timp o alterare ireversibilă a structurii regiunii Fc, care să fie „recunoscută" de receptorii de pe celulele catabolizatoare și să determine fixarea și distrugerea acestor molecule uzate.

8. TULBURĂRI ALE CATABOLIZĂRII IMUNOGLOBULINELOR

În distrofia miotonică se constată o reducere a concentrației IgG în ser, în timp ce celelalte Ig se găsesc la un nivel normal. Rata sintezei IgG este normală, dar rata de catabolizare este mult crescută, T ½ reducîndu-se la 11 zile (față de 23 zile la martorii sănătoși). Creșterea ratei de catabolizare se datorește unui defect în mecanismul de catabolizare al IgG, și nu sintezei unei IgG cu o structură particulară sau existenței unor anticorpi anti-IgG [3].

În ataxia telangiectasia se constată o reducere considerabilă a nivelului IgA (și IgE) în ser. Ea este provocată mai ales de un defect în sinteza de IgA, dar, în unele cazuri, este asociată și cu o rată de catabolizare crescută. S-a dovedit că catabolismul crescut al IgA în unele cazuri de ataxia telangiectasia este provocat de prezența anticorpilor circulanți anti-IgA care produc eliminarea rapidă a IgA sintetizate. Absența IgA din ser este destul de frecventă în populația umană și ar putea fi determinată, în unele cazuri, nu numai de o deficiență în sinteză, dar și de o hipercatabolizare instrumentată de anticorpi anti-IgA [3].

Hipoproteinemia hipercatabolică idiopatică familială este asociată cu un nivel scăzut al IgG, în timp ce celelalte clase de Ig sînt în limite normale. S-a determinat că în aceste cazuri rata fracțională de catabolizare este de 5 ori mai mare decît cea normală (35 % din cantitatea totală intravasculară de IgG este catabolizată pe zi). Și în aceste cazuri s-a apreciat că este defect mecanismul endogen de catabolizare a IgG [3].

La bolnavi cu uremie și pierderea completă a nefronului s-a înregistrat o creștere de 10 ori mai mare a concentrației lanțului L în ser. S-a constatat că rata catabolizării este mult încetinită în aceste cazuri, înregistrîndu-se un timp de înjumătățire de 10 ori mai lung. Prelungirea timpului de înjumătățire este provocată de pierderea întregului nefron, locul de catabolizare al lanțului ușor (vezi paragraful 6).

9. CONCLUZII

Bilanţul pozitiv al cercetărilor întreprinse asupra catabolizării Ig poate fi formulat astfel :

1. Catabolizarea Ig poate fi evaluată cantitativ şi valorile pot fi utilizate în clinică.

2. Sînt caracterizate stările patologice determinate de tulburări ale metabolismului imunoglobulinelor.

3. Se cunosc factorii fiziologici care controlează transportul şi distrugerea imunoglobulinelor în organism.

4. Sînt evidenţiate ţesuturile care sînt implicate în catabolizarea Ig şi sînt caracterizate parţial etapele principale ale catabolizării Ig.

Nu au primit răspuns satisfăcător, bazat pe fapte experimentale, întrebări exenţiale pentru înţelegerea mecanismului catabolizării, ca :

1. Care este regiunea din molecula Ig ce controlează catabolizarea ?

2. Care sînt cauzele uzurii metabolice la nivelul moleculei de Ig ?

3. Interacţiunea Ig cu celulele implicate în catabolism necesită existenţa unor receptori de recunoaştere a selfului (molecula nativă) (receptori de protecţie) sau a non-selfului (molecula uzată) (receptori distructivi) ?

Este evident că numai răspunsuri coerente, la aceste întrebări, vor aduce sporul de cunoaştere indispensabil pentru controlul proceselor catabolice ale anticorpilor în organismul viu, sarcină imposibil de executat în prezent.

Prezentat la redacţie la 27 septembrie 1973

Institutul de patologie şi genetică medicală „Victor Babeş" Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. G. M. Edelman, Biochemistry, **9**, 3197 (1970).
2. J. W. Uhr, E. S. Vitetta, Fed. Proc., **32**, 35 (1973).
3. T. A. Waldman, W. Strober, Progr. Alergy, **13**, 1 (1969).
4. J. J. Marchalonis, Biochem. J., **113**, 299 (1969).
5. L. Buzilă, D. Onică, V. Gheţie, St. cerc. biochim., **14**, 135 (1971).
6. N. Spiegelberg, B. Fishkin, H. Grey, Fed. Proc., **27**, 731 (1968).
7. A. Morell, W. D. Terry, T. A. Waldman, J. clin. Invest., **49**, 673 (1970).
8. T. A. Waldman, W. Strober, R. M. Blase, Progress in Immunology, Acad. Press, New York, 1971, p. 890.
9. F. W. R. Brambell, W. A. Hemmings, I. G. Morris, Nature, **203**, 1352 (1964).
10. F. W. R. Brambell, Lancet ii, 1087 (1966).
11. J. L. Fahey, A. G. Robinson, J. exp. Med., **118**, 845 (1963).
12. F. W. R. Brambell, W. A. Hemmings, C. L. Oakely, R. R. Porter, Proc. roy. Soc., B **151**, 478 (1960).
13. C. Inchley, H. M. Grey, J. W. Uhr, J. Immunol., **105**, 362 (1970).
14. H. Spiegelberg, Comunicare personală.
15. N. J. Cline, J. Sprent, N. L. Warner, A. W. Harris, J. Immunol., **108**, 1126 (1972).
16. D. Yasmeen, J. R. Ellerson, K. J. Dorrington, R. H. Painter, J. Immunol., **110**, 1706 (1973).
17. S. Cohen, A. H. Gordon, C. Matthews, Biochem., J., **82**, 197 (1962).
18. S. B. Andersen, J. Glenert, K. Wallewik, J. clin. Invest., **42**, 1873 (1963).
19. V. Gheţie, C. Medeşan, Rev. roum. Biochim., **6**, 117 (1969).

20. C. MEDEȘAN, V. GHEȚIE, N. CHIȘIU, *Conferința națională de fiziologie*, București 1967, Rezumate pag. 36.
21. L. BUZILĂ, Rev. roum. Biochim., **10**, 95 (1973).
22. M. TAN, W. EPSTEIN, Immunochemistry, **9**, 9 (1972).
23. V. GHEȚIE, A. SULICA, Immunochemistry, **7**, 125 (1970).
24. V. GHEȚIE, C. MOTAȘ, Immunochemistry, **8**, 89 (1971).
25. V. GHEȚIE, S. MIHĂESCU, Immunochemistry, **10**, 251 (1973).
26. C.MOTAȘ, C. SARMANIOTI, Rev. roum. Biochim., **10**, 203 (1973).
27. C. MOTAȘ, V. GHEȚIE, S. MIHĂESCU, St. cerc. biochim., **14**, 171 (1971).
28. V. GHEȚIE, C. MOTAȘ, Immunochemistry, **8**, 1021 (1971).
29. T. G. LAWRENCE, R. C. WILLIAMS, J. exp. Med., **125**, 233 (1967).
30. V. GHEȚIE, Microbiol. Parazitol. Epidemiol., **27**, 314 (1972).
31. V. GHEȚIE, L. BUZILĂ, Rev. roum. Biochim., **9**, 125 (1972).
32. H. WALTER, Nature, **198**, 189 (1963).
33. T. A. WALDMAN, V. GHEȚIE, *Progress in Immunology*, Acad. Press, New York, 1971, p. 1183.
34. M. PERRY, D. GARLIK, J. Int. Res. Commun., **1**, 19 (1973).

ST. CERC. BIOCHIM., 17, 1, 97—118 (1974)

RECENZII

L'HÉPATITE VIRALE, *Rapport d'un Groupe scientifique de l'OMS* (Hepatita virală, Raportul unui grup ştiinţific al OMS), OMS Série de rapports techniques, no. 512, Geneva 1973, 59 pag.

Încă de la înfiinţarea sa, Organizaţia Mondială a Sănătăţii (OMS) a recunoscut importanţa problemei hepatitei virale pentru sănătatea publică.

Între 25 şi 30 septembrie 1972 s-a reunit la Geneva un grup internaţional de experţi şi acest raport prezintă punctele de vedere comune adoptate cu acest prilej. Raportul tratează probleme legate de hepatita virală A (epidemică sau infecţioasă) şi, mai pe larg de hepatita virală B (serică). Astfel în legătură cu hepatita virală A sînt trecute în revistă probleme care privesc simplificarea terminologiei, identificarea agentului, cercetări în culturi de celule şi pe voluntari, pe animale şi la microscopul electronic. În legătură cu hepatita virală B sînt tratate probleme de repartiţie geografică, perioadă de incubare, transmitere, medicaţie, factor genetic, subtipurile antigenului, imunopatologie, boli cronice, carcinoame hepatocelulare şi leziunile extrahepatice adiacente. Sînt descrise metode de detectare şi măsurare a antigenului şi a anticorpilor hepatitei virale B, ca de ex. imunodifuzia, electro-sinereza, imunoaderenţa, aglutinarea particulelor de latex, hemaglutinarea pasivă şi inhibarea ei, titrarea radio-imunologică. În ceea ce priveşte hepatita virală B, sînt studiate şi diferite aspecte pe care ea le prezintă în diferite medii sociale şi perspectivele de imunizare şi imuno-terapie.

Considerăm folositoare această succintă trecere în revistă a principalelor aspecte pe care le prezintă astăzi hepatita virală, atît pentru cei care lucrează în acest domeniu, cît şi pentru cei care vor să-şi lărgească orizontul cunoaşterii în acest domeniu.

Cristina Bandu
Centrul de Biostructură
Bucureşti

Az Agrártudományi Egyetem Közleményei (Buletinul Universităţii de Ştiinţe Agricole), vol. I şi II, ed. Dr. Stefanovits Pal, Agrártudományi Egyetem, Gödöllö, 1971, 394 şi 410 pag.

Universitatea de Ştiinţe Agricole din Gödöllö (R.P. Ungară) a ţinut între 20 şi 22 mai 1970, o adunare festivă, urmată de o sesiune ştiinţifică, cu ocazia aniversării a 25 de ani de la înfiinţare şi a centenarului zilei de naştere a lui V.I. Lenin. Cu acest prilej a fost editată culegerea de faţă, care cuprinde un număr de 95 de articole, grupate în şapte secţiuni, şi reprezintă o sinteză a rezultatelor ştiinţifice obţinute de profesorii şi cercetătorii Universităţii.

Volumul începe cu o introducere urmată de o secţiune sociologică, care a evidenţiat şi analizat autoritatea ideilor lui V.I. Lenin. Urmează secţiunile care se ocupă de creşterea animalelor şi mecanizarea acesteia, biologie, maşini agricole şi mecanizarea recoltării, o secţiune de economie şi alta de economia şi protecţia apelor.

La sfîrşitul fiecărei secţiuni, articolele expuse sînt rezumate în limbile rusă, engleză şi germană, ceea ce face ca aceste două volume să devină accesibile unui număr mare de cercetători.

Cristina Bandu
Centrul de Biostructură
Bucureşti

S. D. SCHULTZ-HAUDT, *Histochemistry of Connective Tissue Ground Substances* (Histochimia substanţelor fundamentale ale ţesutului conjunctiv), Progr. Histochem. Cytochem., 5, 2, G. Fischer, Stuttgart, 1973, 47 pag., 17 fig.

Monografia lui Stig Schultz-Haudt reprezintă o punere la punct clară, precisă şi actuală într-un domeniu în care se simţea nevoia unei sinteze a materialului existent, deosebit de vast dar în acelaşi timp contradictoriu şi disparat.

Utilizînd terminologia propusă de Balázs, autorul studiază în două părţi distincte clasele mari de componenţi ai substanţei fundamentale; proteoglicanii (vechii termeni erau de „mucoproteine" sau „complexe mucoproteine acide-proteine") şi glicoproteinele. Se precizează structura lor chimică, biochimia şî biologia lor în organism, se expun pe larg metodele de identificare şi cantificare. Autorul insistă asupra valorii diferitelor reacţii chimice şi, în special, histochimice de identificare, a posibilităţilor de diferenţiere, extracţie şi fracţionare. Această parte este expusă cu o grijă deosebită pentru aprecierea corectă şi reală a diferitelor metode utilizate, pentru explicarea lor cît mai completă. Într-o ultimă parte se trec în revistă şi cîteva aspecte legate de proprietăţile imunologice ale substanţelor studiate.

Bibliografia bogată, ilustraţia demonstrativă, aspectul de sinteză, spiritul critic, punctele de vedere originale ale autorului, fac din această lucrare un instrument preţios de lucru pentru histochimişti şi biochimişti.

Aurelia Bordeianu
Institutul de fiziologie normală şi patologică
Bucureşti

Immunological diseases (Boli imunologice), Ed. II-a, Editor M. Samter, Ed. Little Brown & Co., Boston, 1971.

Cartea a apărut în două volume şi cuprinde cinci părţi.

Partea întîi, *Imunologie de bază*, tratează despre : antigene şi răspunsul imun, interacţiuni antigen-anticorp şi consecinţele biochimice ale acestei interacţiuni.

Partea a doua, *Alterările imunologice nonatopice*, se ocupă de răspunsul la agenţi şi măsuri terapeutice, de boli cu răspuns imun anormal şi hipersensibilitatea la agenţi infecţioşi.

În partea a treia, intitulată *Boli atopice*, este subliniat modul în care diverse antigene determină o boală atopică. Se arată, de asemenea, felul anticorpilor prezenţi la pacienţii cu boli atopice şi cei care apar în timpul tratamentului. Această parte cuprinde şi patogenia, evoluţia clinică şi tratamentul rinitei alergice, astmului bronşic şi alergiei la insecte.

În partea a patra sînt prezentate reacţiile alergice ale pielii.

Partea a cincea, *Boli cu caracteristici imunologice*, tratează despre bolile ţesutului conjunctiv şi cele care se pot asocia cu acestea, despre bolile sistemelor endocrin şi exocrin şi bolile altor organe (sistem venos, ochi, ficat, colon şi miocard).

Bibliografia consultată de autori, specificată la sfîrşitul fiecărei secţiuni, este foarte bogată şi cuprinde lucrări apărute pînă în 1970.

Cartea se adresează în special clinicienilor internişti, endocrinologi, şi dermatologi, dar şi medicilor imunologi şi imunochimişti.

Maria Elena Dan
Inst. de Patologie şi Genetică
Medicală „Victor Babeş"
Bucureşti

World review of nutrition and dietetics (Trecere în revistă a literaturii mondiale în domeniul nutriţiei şi dieteticii), Editor G. H. Bourne, Ed. S. Karger, Basel, München, Paris, London, New York, Sydney, 1973, 327 + XII p., 18 fig., 29 tab.

Acest periodic a apărut pentru prima oară în 1959, urmînd apoi apariţii anuale şi chiar bianuale. Volumul de faţă este primul care conţine publicaţii originale apărute între 1959 şi 1963, care acum sînt de neobţinut, pe care autorii le-au adus la zi, ţinînd seama de considerabilele progrese realizate în domeniile respective. Astfel, subiectele tratate sînt în legătură cu: sinteza biologică a acidului ascorbic, rolul fructelor citrice şi produselor citrice industrializate în nutriţia omului, digestia proteinelor (consideraţii nutriţionale şi metabolice), energia şi metabolismul în timpul expunerii la condiţii extreme de viaţă, cerinţe nutriţionale ale embrionului, condiţii de nutriţie în Jugoslavia şi repercusiunea lor asupra sănătăţii.

În afară de aceste subiecte reluate, volumul este precedat de un articol de ansamblu care prezintă unele date istorice asupra dieteticii, iar în ultima parte se prezintă relaţiile dintre nutriţie şi sănătatea publică; în acest ultim articol se subliniază necesitatea cooperării cercetărilor social-economice, clinice, de patologie experimentală, fiziologie celulară etc., în vederea înţelegerii bazelor metabolice ale practicii medicale şi a posibilităţilor de prevenire a bolilor, printr-o alimentaţie bună şi condiţii mai bune de viaţă.

Fiecare articol este urmat de o bogată bibliografie la zi; util este faptul că la sfîrşit sînt date sumarele volumelor 5 — 17, precum şi lista autorilor. Un index pe subiecte înlesneşte consultarea acestui volum.

Această monografie prezintă importanţă şi valoare nu numai din punct de vedere ştiinţific, ci şi istoric.

Viorica Elefterescu
Centrul de biostructură
Bucureşti

Recent advances in medicine (Progrese recente în medicină), Ed. XVI, Editor D. N. Baron, N. Compston, A. M. Dawson, Churchill Livingstone, Edinburgh, London, 1973

În acest volum sînt discutate cîteva dintre domeniile medicinei cele mai controversate în ultimii cinci ani, autorii fiecărui capitol fiind implicaţi direct în cîmpurile respective de cercetare.

Astfel, D.N.S. Kerr (Wisconsin) face o sinteză a mijloacelor moderne de tratament în insuficienţa renală cronică, iar C.M. Oakly (Londra) aduce o nouă clasificare etiologică a bolilor muşchiului cardiac, cu caracterizarea lor clinică, electrică şi terapeutică. Homeostazia calciului în organism (investigare clinică şi paraclinică — M. R. Wills — Londra) şi deviaţiile sale patologice sînt tratate prin prisma mecanismelor moleculare de acţiune a parathormonului şi calcitoninei.

Problema perturbărilor psihice şi metabolice influenţate de consumul excesiv de alcool etilic (B.D. Hore — Manchester; M.L. Clark — Londra) este situată atît sociologic cît şi clinic. Psihiatria beneficiază în acest volum de o punere la zi a psihofarmacologiei (R.H.S. Mindham — Nottingham).

Aplicaţiile clinice ale cercetărilor în imunologie din ultimii ani permit o clasificare şi o descriere a bolilor imunologice (R.W. Reevs — Londra) şi o caracterizare clinică şi terapeutică amănunţită a patologiei imune a aparatului respirator (M.T. Warwick — Londra).

Capitole mai restrînse ca: Infecţiile virale ale tractului respirator (R.B. Heath), Sindroame paraneoplazice (E.G. Anderson), Neuropatia periferică (P. Le Quesne), Tulburările sintezei de hemoglobină (E.R. Huehus), precum şi descrierea de tehnici paraclinice (scintigrafia — H. S. Williams) şi biostatistice (J. Chamberline) aduc precizări de ultimă oră şi unor domenii mai restrînse de practică medicală.

Cartea este recomandată, de către autori, clinicienilor şi oamenilor de laborator, absolvenţilor facultăţii şi medicilor practicieni de orice specialitate, pentru a fi puşi la curent cu cele mai recente cercetări medicale, în sensul cel mai larg al cuvîntului, din alte specialităţi decît cele practicate.

Lidia Gancevici
Institutul de patologie şi genetică
medicală „V. Babeş"
Bucureşti

GEORGE G. GUILBAULT, *Enzymatic Methods of Analysis* (Metode enzimatice de analiză), Pergamon Press, Oxford, 1971, 347 pag.

Enzimele reprezintă, din multe puncte de vedere, reactivi analitici ideali. Cu ajutorul lor pot fi dozate cantităţi de ordinul a 10^{-10} g, adesea fără a fi necesară o purificare prealabilă a probei de analizat. Progresele recente făcute în procedeele de purificare, conservare şi evidenţiere a activităţii au eliminat în mare parte dezavantajele utilizării enzimelor în practica curentă. În acest context, cartea lui G.G. Guibault, autor cunoscut prin numeroase articole originale şi referate publicate în Analytical Biochemistry şi Analytical Chemistry, este o apariţie oportună şi deosebit de necesară.

Cartea are 8 capitole, un apendix cu firmele producătoare de enzime, indici de autori şi subiecte, o prefaţă şi o bogată listă bibliografică. Scopul cărţii este acela de a forma un mod de a gîndi operaţional, necesitate din ce în ce mai imperioasă în explozia informaţională din biochimia modernă.

Capitolul 1 indică parametrii enzimatici principali care trebuie luaţi în considerare în practica analitică. Urmează, în capitolul 2, descrierea metodelor de dozare chimică şi iustrumentală a activităţii enzimelor. Se insistă mai ales asupra metodelor spectrofotometrice (clasice astăzi) şi spectrofluorimetrice, dar şi asupra unor tehnici electrochimice şi radiochimice care măresc sensibilitatea metodelor cu cel puţin două ordine de mărime.

Capitolul 3 descrie aplicaţii practice ale acestor metode la dozarea activităţii a cîteva zeci de tipuri de enzime. Este remarcabilă importanţa din ce în ce mai mare acordată metodelor spectrofluorimetrice (multe substrate fiind introduse pentru prima dată de autorul cărţii), electrochimice şi radiochimice, prin utilizarea unor dispozitive simple şi ingenioase.

Într-o succesiune logică, capitolele 4, 5 şi 6 tratează dozarea diferitelor substanţe care sînt respectiv substrate, activatori (şi coenzime) sau inhibitori pentru enzime. În felul acesta pot fi dozate cîteva sute de substanţe organice şi anorganice.

Ultimele două capitole expun două aspecte de mare actualitate în perspectiva utilizării dozărilor enzimatice, şi anume utilizarea enzimelor imobilizate în suport solid (legate covalent sau înglobate) şi automatizarea analizelor.

Stilul clar şi concis, numeroasele tabele şi grafice uşurează înţelegerea textului. Condiţiile grafice bune asigurate de editura Pergamon Press, contribuie de asemenea la succesul acestei apariţii.

Cartea se recomandă călduros cercetătorilor din domeniul biochimiei generale şi clinice, al chimiei analitice şi toxicologiei.

Gheorghe Jebeleanu
Disciplina de biochimie
IMF, Cluj

T. ARENDS, G. BEMSCHI, R. T. NAGEL, *Genetical, Functional and Physical Studies of Hemoglobins* (Studii genetice, funcţionale şi fizice ale hemoglobinelor), S. Karger, Basel , München, Paris, London, New York, Sydney, 1971, 293 pag.

Volumul cuprinde lucrările primului Simpozion Inter-American asupra hemoglobinelor, ţinut în decembrie 1969 la Caracas. Articolele publicate sînt grupate în trei capitole, precedate de o prefaţă a editorilor : *1*) Distribuţia geografică şi problemele geneticii hemoglobinelor (10 lucrări) ; *2*) Funcţia hemoglobinelor (13 lucrări) şi *3*) Studii fizice ale moleculei de hemoglobină (10 lucrări). Fiecare capitol are o introducere semnată de autori de mare prestigiu în domeniul respectiv.

În introducerea primei părţi, H. Lehmann trasează principalele probleme ridicate de genetica hemoglobinelor şi utilizarea acestor date în antropologie, etnografie şi biologia generală a omului. Menţionăm cu plăcere referirile făcute la cercetările din ţara noastră. Se remarcă o lucrare a unui grup de cercetători de la Universitatea Ann Arbor şi de la cea din Copenhaga care dovedeşte existenţa a cel puţin două locusuri de codificare pentru lanţurile alfa.

Lucrările părții a doua sînt precedate de o introducere a lui G. Guidotti în care se rezumă aspectele actuale ale relației structură — funcție la hemoglobine : deosebirile dintre structura oxi-și aceea a deoxihemoglobinei, factorii care determină modificările de structură, explicații ale comportamentului alosteric în termenii interacțiunii între subunități, interacțiunea efectorilor mic moleculari cu lanțurile hemoglobinei. Cercetările prezentate aduc numeroase date noi sau, precizări de mare finețe. Astfel, subunitatea minimă necesară cooperativității pare să fie α_1, β_1 O_2 s-ar lega sub forma unui superoxid, iar Fe hemului ar fi în forma feri. Deosebit de interesantă ni s-a părut perfecționarea tehnicii flash-fotolizei, adusă de S. J. Edelstein și Q. H. Gibson, prin care se identifică cinetic intermediarii conformaționali ce apar după deoxigenare.

Acumularea de numeroase cunoștințe a adus știința de astăzi în situația cea mai favorabilă pentru coroborarea datelor fizice cu cele biologice și medicale, dînd astfel posibilitatea de a da răspuns unor întrebări din ce în ce mai profunde. Acest lucru este ilustrat din plin de capitolul al treilea al cărții.

M. Guterman trece în revistă tehnicile moderne aplicabile în cercetările pe hemoglobină. Pornind de la datele cristalografice ale lui Perutz și Kendrew (devenite clasice), metodele moderne cum sînt EPR, NMR, spectroscopia în infraroșu îndepărtat, spectrele Mössbauer, difracția neutronilor, permit abordarea unor probleme deosebite cum ar fi condițiile minime necesare legării reversibile a O_2, mecanismele fizice care explică cooperativitatea sau efectul Bohr. Fenomenele investigate tind să-și găsească explicații în termeni structurali de ordinul a 0,1 Å.

Condițiile grafice și ilustrația asigurate de editura S. Karger sînt de o foarte bună calitate.

Cartea este recomandată în special celor interesați în biologia și patologia moleculară, în biochimie generală și în biofizică, dar și specialiștilor în antropologie sau etnografie, precum și fizicienilor care doresc să lege cunoștințele lor de cele biologice.

Gheorghe Jebeleanu
Disciplina de biochimie
IMF, Cluj

K. H. PFENNINGER, *Synaptic Morphology and Cytochemistry* (Morfologia și citochimia sinaptică), Prog. Histochem. Cytochem., 5, 1, G. Fischer, Stuttgart, 1973, 88 pag.

Această lucrare de sinteză prezintă stadiul actual al cunoștințelor asupra sinapsei, integrînd date recente de morfologie, fiziologie și biochimie în scopul înțelegerii mecanismelor sinaptice. Autorul s-a făcut cunoscut prin numeroase și remarcabile lucrări de morfologie electronmicroscopică a sinapsei, folosind tehnici citochimice, de ,,Freeze-fracturing'' și ,,freeze-etching'' și urmărind interrelația între componentele structurale și moleculele implicate în funcția sinaptică.

În prima parte se inventariază, comentează și interpretează metodele citochimice utilizate de microscopia electronică în sinaptologie. Organizarea sistematică a materialului, discernămîntul și accentuatul caracter practic fac din această parte un valoros ghid metodologic pentru cercetătorul interesat.

A doua parte prezintă rezultatele la zi ale investigațiilor citochimice, cu permanenta preocupare de a le utiliza pentru înțelegerea funcției sinaptice. În regiunea sinaptică, învelișurile plasmalemale intern și extern sînt specializate, formînd aparatul sinaptic, constituit din

proiecţiile dense presinaptice, materialul din fisura sinaptică şi din densităţile postsinaptice. Se prezintă compoziţia chimică a diverselor structuri, aspectele lor ultrastructurale, originea şi rolul fiziologic.

Iconografia electron-microscopică bogată şi bibliografia vastă întregesc această lucrare a cărei lectură, pe lîngă beneficiul documentar, procură o reală satisfacţie prin ţinuta sa ştiinţifică şi conciziune.

Victor V. Jinga
Institutul de fiziologie normală şi patologică
Bucureşti

The bacteriocins (Bacteriocinele). Editat de P. Reeves, Springer Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1972 142, p.

Volumul 11 din seria ,,Biologie moleculară, biochimie şi biofizică'' reprezintă o amplă monografie asupra bacteriocinelor, substanţe produse de anumite suşe de bacterii şi letale pentru alte bacterii, strîns înrudite cu ele. Descoperite în anul 1925, acest grup de proteine se caracterizează printr-un spectru de acţiune foarte larg, afectînd profund diferite procese metabolice ale gazdei, ca sinteza proteică şi a acizilor nucleici, fluxul energetic din celulă, modificări la nivelul membranei şi altele. De-a lungul celor 7 capitole ale cărţii sînt minuţios conturate aspecte multiple legate de producerea bacteriocinelor, de chimia şi genetica lor, de adsorbţia şi modul de acţiune, de rolul lor în ecologie, de relaţiile dintre bacteriocine şi bacteriofagi, subliniindu-se totodată marea lor varietate. Fiecare capitol este bogat ilustrat şi cuprinde experienţele de bază ce au condus la caracterizarea detaliată a grupului de proteine care sînt bacteriocinele. Cartea se încheie cu un catalog al bacteriocinelor după o clasificare ce a avut la bază suşa de bacterii producătoare.

Prin tematica abordată, prezenta monografie se anunţă a fi de un real folos microbiologilor şi cercetătorilor din domeniul biologiei moleculare. Glosarul, bibliografia şi indexul de subiecte uşurează efectiv munca celor interesaţi. Multitudinea problemelor incluse, alături de ţinuta grafică ireproşabilă, sînt calităţi de bază ale acestui volum care oferă o privire de ansamblu asupra bacteriocinelor.

Ioana Hagima
Centrul de Biostructură
Bucureşti

H. MOHR, *Lectures on photomorphogenesis* (Prelegeri asupra fotomorfogenezei) Springer-Verlag, Berlin — Heidelberg — New York, 1972, 237 p., 219 fig.

Cartea de faţă se înscrie pe linia prezentării unor cercetări de profunzime din biologia modernă. Cele 24 prelegeri incluse în volum tratează diferite aspecte ale identificării şi izolării pigmentului fotoreceptor, fitocromul, a cărui descoperire constituie o realizare de seamă.

Astfel, din lectura cărţii ne familiarizăm cu unele proprietăţi ale fitocromului, localizarea sa intracelulară, relaţii fitocrom-enzime, antociani, proteine, influenţa sa asupra hormonilor de creştere, asupra diferitelor mişcări ale plantelor (fotonastii, fototropism). Alte prelegeri se ocupă de raporturile multiple dintre pigmentul fotoreceptor şi germinarea seminţelor, dezvoltarea plastidelor, iniţierea înfloririi. Sînt tratate cu discernămînt faţetele multiple ale fenomenului de fotomorfogeneză ca: energetica sa, influenţa diferitelor spectre luminoase etc.

Datele experimentale s-au obţinut folosindu-se o gamă largă de plante inferioare şi superioare şi tehnici variate şi moderne. Remarcăm de asemeni că între prelegeri există unele conexiuni logice, iar observaţiile microscopice confirmă datele biochimice.

Volumul se încheie cu prezentarea în ordine alfabetică a literaturii citate şi cu un index de subiecte. Cele 219 figuri incluse se caracterizează prin claritate şi o ţinută grafică ireproşabilă.

Prin multiplicitatea problemelor descrise, prezentul volum constituie o sursă preţioasă de informaţii nu numai pentru biochimistul sau fiziologul vegetal, ci şi pentru alţi cercetători din domenii înrudite.

Hagima Ioana
Centrul de Biostructură
Bucureşti

Molecular bioenergetics and macromolecular biochemistry (Bioenergetică moleculară şi biochimia macromoleculelor), Ed. H.H. Weber, Springer Verlag, Berlin — Heidelberg — New York, 1972, 197 pagini.

Prezenta carte reuneşte într-un volum lucrările Simpozionului Meyerhof, ce a avut loc la Heidelberg între 5—8 iulie 1970, organizat în memoria unuia dintre savanţii iluştri ai secolului XX, Otto Meyerhof, de la a cărui moarte s-au împlinit 20 de ani în 1971, iar în 1972, 50 de ani de la acordarea premiului Nobel.

În cadrul simpozionului, la care au luat parte 17 invitaţi, dintre care 7 laureaţi ai premiului Nobel, au fost prezentate lucrări privitoare la viaţa, activitatea şi personalitatea lui Otto Meyerhof; structura şi mecanismul de acţiune al aldolazei Meyerhof în lumina achiziţiilor recente ale enzimologiei au constituit subiectul unei interesante comunicări.

Alţi invitaţi au tratat teme ca sintetazele acizilor graşi din drojdii şi complexele multienzimatice înrudite, rolul factorilor ribozomali în iniţierea lanţului polipeptidic, biosinteza fără acizi nucleici a polipeptidelor gramicidină S şi tirocidină.

Structura moleculară a sistemului actomiozinic în muşchiul striat şi reglarea fiziologică a activităţii sale, mecanismul carcinogenezei, dinamica şi selectivitatea transportorilor de ioni alcalini, pompa sarcoplasmatică de calciu, precum şi bioenergetica, proprietăţile şi funcţia proteinelor din membranele excitabile asociate bioelectrogenezei, au constituit subiectul altor comunicări deosebit de interesante.

Lucrarea include la sfîrşitul comunicărilor o bogată bibliografie, terminîndu-se cu un index de autori şi unul de subiecte.

Cornelia Mihai
Institutul Oncologic Bucureşti

Comparative organellography of the cytoplasm (Organelografia comparată a citoplasmei), A. Frey-Wyssling, Springer Verlag, Wien, New York, 1973, 106 pagini, 31 figuri, 5 tabele.

Lucrarea prezentă face parte din seria a III-a — „Cytoplasmic organelles" (Organite citoplasmatice) inclusă în colecţia „Protoplasmatologia". Ca botanist, autorul insistă asupra problemelor de citologie a plantelor şi, în special, asupra acelora care au scăpat pînă acum atenţiei biologilor. De aceea, cartea nu poate fi un curs introductiv, ci, beneficiind de metoda comparativă de prezentare, se adresează biologilor, biochimiştilor, studenţilor în medicină şi agronomie care au o experienţă suficientă în citologia animală sau vegetală.

Se prezintă, astfel, date recente despre ultrastructura, dinamica, creşterea şi funcţiile plasmalemei şi derivaţilor ei, ultrastructura şi rolul în acumulare şi secreţie al aparatului Golgi, precum şi relaţiile de identitate ale acestuia cu plasmalema.

Ultrastructura reticulului endoplasmic şi rolul său în translocarea intracelulară şi nutriţie sînt corelate cu formarea centrilor metabolici (sferozomi, lizozomi, vacuole şi peroxizomi); la acestea se adaugă compararea cu plasmalema şi prezentarea derivaţilor reticulului endoplasmic.

Alte capitole se ocupă de ultrastructura, ontogenia, autoreproducerea şi funcţiile centriolilor şi microtubulilor.

Cartea conţine o bogată bibliografie, un index de autori şi un altul de subiecte.

Cornelia Mihai
Institutul Oncologic Bucureşti

Quantitative Struktur-Funktions Korrelation an Biomembranen (Corelaţia cantitativă structură-funcţie în biomembrane), Ed. H. Plattner, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart — Portland — Oregon, USA, 1973, 37 pagini, 13 figuri, 6 tabele.

Lucrarea (Vol. 5 nr. 3 din *Progress in histochemistry and cytochemistry*) abordează în mod concis problema măsurii în care organizarea structurală a diferitelor tipuri de biomembrane poate fi corelată cu proprietăţile funcţionale ale acestora. Sînt discutate, astfel, posibilităţile şi limitele corelaţiilor cantitative ce se stabilesc între măsurătorile citomorfometrice ale densităţilor biomembranelor şi determinările activităţilor enzimatice caracteristice. În acest scop, se compară profilul densităţilor enzimatice al membranelor provenind din muşchii „roşii" şi „albi"; se urmăreşte acelaşi parametru şi în membranele interne ale mitocondriilor de ficat, cu care ocazie se constată o variaţie a acestuia, ceea ce se corelează bine cu descreşterea activităţii respiratorii a ficatului diferitelor specii de mamifere, o dată cu creşterea greutăţii corporale.

Aceeaşi metodă a comparării datelor histodensitometrice şi citomorfometrice este utilizată în scopuri cantitative şi la împărţirea în zone a lobilor ficatului, la caracterizarea mitocondriilor din inimă, la cercetarea mitocondriilor în timpul proceselor de diferenţiere. Dificultăţi considerabile apar cînd se încearcă corelarea datelor structurale şi funcţionale asupra biomembranelor care sînt considerate heterogene, cum ar fi reticulul endoplasmic.

Metoda propusă de autor implică posibilitatea corelării directe, *in situ*, a datelor funcționale și structurale ; compararea datelor enzimatice și citomorfometrice permite localizarea enzimelor pe anumite substructuri topografice ale biomembranelor, chiar cînd acestea nu sînt accesibile subfracționării.

Cornelia Mihai
Institutul Oncologic București

Micro-autoradiography and electron probe analysis. Their Application to Plant Physiology. (Micro-autoradiografia și analiza prin electroni. Aplicațiile lor în fiziologia plantelor.), Ed. U. Lüttge. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1972, 242 p., 78 figuri.

Cartea se referă la noi metode de mare finețe pentru localizarea citologică a substanțelor, în scopul obținerii de informații privind distribuția lor la diferite nivele și organizarea celulară. Aceste cunoștințe sînt indispensabile în studiul reglării proceselor metabolice și al rolului organizării celulare în translocarea substanțelor.

Microautoradiografia a fost aplicată în mai mare măsură în medicină și zoologie, și puțin, numai în ultimii ani, în cercetări de fiziologie vegetală : transportul substanțelor în corpul plantelor și biosinteza cîtorva substanțe.

Auto-radiografia dă informații asupra cantităților relative de radioactivitate și, în unele cazuri, asupra celor absolute. Uneori este necesară cunoașterea activităților specifice. Acestea se pot afla dacă, pe lîngă radioactivitate se determină în secțiunea de țesut luată în studiu cantitatea unei substanțe sau a unui element urmărit. Pentru aceasta este utilă analiza prin electroni (electron probe analysis), care dă evaluări cantitative cu o sensibilitate de 10^{-15} — 10^{-16} g. Cuplate, aceste două metode dau activitățile specifice ale substanțelor și elementelor din preparatele microscopice.

Analiza prin electroni (electron probe analysis) constă în principiu din bombardarea preparatelor cu electroni emiși de un tun electronic. Are loc o emisie de raze X, iar spectrele de raze X sînt analizate și dau evaluări calitative și cantitative asupra substanțelor și elementelor prezente în preparat. În carte sînt descrise și unele tehnici înrudite : microscopia electronică analitică, analiza cu ajutorul laser-ului, analiza ionică de masă.

Cartea cuprinde un capitol introductiv scris de editor și alte șapte capitole scrise de diverși specialiști. Primele șase dintre ele privesc microautoradiografia : metode fotometrice în autoradiografia cantitativă, autoradiografia cantitativă în prezența radiației difuze (crossfire), microautoradiografia ionilor anorganici solubili în apă, microautoradiografia compușilor organici solubili în apă, microautoradiografia compușilor organici insolubili în solvenți polari și nepolari, autoradiografia cu microscopul electronic pentru țesuturi vegetale. Ultimul capitol se referă la analiza prin electroni. La fiecare capitol este prezentată bibliografia.

Prezentarea grafică este excelentă.

Cartea este foarte utilă celor ce doresc să deprindă tehnicile de microautoradiografie și analiză prin electroni pe material vegetal.

Florin Mihăilescu
Centrul de Biostructură
București

Biochemical regulatory mechanisms in eukariotic cells. (Mecanisme biochimice de reglare în celulele eucariotice), editat de E. KUN şi S. GRISOLIA, Wiley — Interscience, un departament al ed. John Wiley and Sons, Inc., New York, Londra, Sydney, Toronto, 1972, 530 p.

Avînd la bază cunoştinţele analitice acumulate în ultimii 20 ani asupra structurii celulare, autorii celor 12 articole cuprinse în această excepţională carte prezintă strădania lor de a cunoaşte şi de a înţelege mecanismele de lucru ale celulei vii. Primele şapte capitole se referă la reacţiile constituenţilor macromoleculari celulari. Sînt prezentate astfel, controlul molecular al funcţiei hemoglobinei, mecanismele de reglare care implică fie fosfogliceratul, fie fosfofructokinaza, fie sistemele de enzime interconvertibile, modificările chimice ale enzimelor produse de ATP, reglarea biosintezei „isoprenului activ" pornind de la Acetil-CoA şi cel mai interesant dintre ele, „bazele chemotrofice ale reglării turnover-ului proteic: un tip ireversibil de modificare elastoplastică a enzimei" în care autorii prezintă modificările enzimelor de către efectorii chemotropici, carbamilare, acetilare, fosforilare, adenililare, cu implicaţii în reglarea turnoverului proteic.

Celelalte articole se ocupă de rolul de reglare al poliaminelor în economia celulară, de unele aspecte ale funcţiilor metabolice şi energetice ale mitocondriilor, cu prezentarea rolului factorului metabolic citoplasmatic în reglarea bioenergeticii mitocondriale.

Un capitol discută, prin prismă matematică, problemele cinetice şi termodinamice ale mecanismelor de control biologice şi biochimice. Un ultim capitol se referă la mecanismele de control ale mobilizării şi transportului lipidelor.

Numele şi renumele autorilor ca S. GRISOLIA, E. KUN, T. E. MANSOUR, H. HOLZER, T. P. SINGER, C. F. WALTER etc. conferă cărţii o pondere deosebită, deoarece aceşti mari specialişti încearcă să îmbine materialele acumulate pînă în prezent într-un mozaic celular interdependent, care să explice atît independenţa, cît şi dependenţa multiplelor mecanisme de reglare din interiorul unei celule eucariote. Prin nivelul foarte ridicat al articolelor şi prin calitatea sa excepţională, cartea se adresează cu precădere cercetătorilor specialişti în biochimie sau biologie moleculară.

Cecilia Motaş
Departamentul de Biochimie
Bucureşti

Heidelberger Taschenbücher, FRITZ KAUDEWITZ, Molekular- und Mikroben-Genetik (Genetică moleculară şi microbiană), Springer Verlag, Berlin—Heidelberg— New York, 1973, 426 p., 301 fig., 20 tabele.

Numeroase domenii ale biologiei se află actualmente într-o etapă ce a depăşit descrierea şi inventarierea fenomenelor, ocupîndu-se de elucidarea mecanismelor intime ce stau la baza acestora. Astfel genetica modernă nu poate fi concepută în afara studiului detaliat al acizilor nucleici, substanţe ale căror proprietăţi şi capacităţi de reacţie reprezintă suportul material al diverselor fenomene genetice.

Concepută din acest punct de vedere, cartea ce faţă se ocupă de problema conservării şi exprimării ereditătii şi, în special, de rolul acizilor nucleici în aceste procese. Astfel, ADN

este prezentat în calitatea sa de purtător al informației ereditare, evidențiindu-se modul de conservare a acesteia, conținutul ei. Sînt prezentate modurile de recombinare între purtătorii omologi de informație genetică, proteinele ca expresie materială a informației genetice. Exprimarea informației genetice este prezentată sub cele două aspecte principale : transcripția și translația. Pe această linie se discută dogma centrală a geneticii moleculare, se descriu mecanismele de reglare a funcționării genelor. O atenție deosebită se acordă sintezei — in vivo și in vitro — a ADN și metabolismului general al acestuia.

Cartea este bogat ilustrată, cu scheme originale sau preluate de la publicații recente, o listă bibliografică selectivă, un index de autori și altul de subiecte.

Atît tematica cît și modul de alcătuire vor asigura acestei cărți o bună primire din partea studenților, geneticienilor și altor categorii de specialiști.

Constanța Mușolan
Centrul de Biostructură, București

Scientists in search of their conscience (Oamenii de știință în cercetarea propriei conștiințe), editat de ANTHONY R. MICHAELIS și HUGH HARVEY, Springer Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1973, 230 p.

Cartea de față cuprinde lucrările simpozionului „Impactul științei asupra societății" organizat în iunie 1971 la Bruxelles, de către Comitetul European al Institutului Weizmann din Israel. La simpozion au participat personalități marcante din diferite ramuri științifice. Discuțiile s-au purtat în jurul problemei responsabilității oamenilor de știință față de sensul social al descoperirilor științifice. Expunerile au fost deosebit de interesante, vizînd cele mai diferite aspecte ale relației om de știință-societate. Aș cita în acest sens titlurile cîtorva comunicări: „Este pregătită societatea de azi să facă față unui viitor tehnologic?"; „Apropierea omului de știință de valorile umane"; „Fizica în raport cu gîndirea și acțiunea umană"; „Impactul științelor fizice asupra societății" etc.

Dintre numeroasele idei interesante lansate în cadrul acestui simpozion, o concluzie se impune cu deosebită acuitate : în epoca noastră oamenii de știință sînt conștienți de faptul că procesul și rezultatele cunoașterii nu mai pot fi rupte de contextul lor social. Este semnificativ că la un simpozion cu o asemenea tematică, o mare parte din participanți au fost cercetători din domenii ale biologiei. Constatarea este relevantă pentru importanța pe care științele biologice au căpătat-o în ansamblul vieții sociale, ca urmare a progresului rapid marcat de aceste științe în ultimele decenii.

În afara problemei principale — eficacitatea socială a cercetării științifice — au fost abordate multe alte teme, de interes practic și teoretic, privind sensul dezvoltării viitoare a științei, probleme de cooperare științifică internațională, aspecte etice ale cercetării, necesitatea unui moratoriu al oamenilor de știință etc.

Prin consemnarea acestor dezbateri, volumul de față este încă un document care atestă creșterea responsabilității sociale a oamenilor de știință, preocuparea lor susținută de a se integra și de a răspunde cerințelor societății în care trăiesc.

Constanța Mușolan
Centrul de Biostructură, București

Biogenesis ; *Evolution* ; *Homeostasis* (Biogeneza ; Evoluţie ; Homeostazie), editat de A. LOCKER, Springer Verlag, Berlin — Heidelberg — New York, 1973, 190 p., 13 fig.

Volumul de faţă reprezintă o formulă originală în domeniul schimbului de informare ştiinţifică, în sensul că el cuprinde lucrările unui ,,simpozion prin corespondenţă". Mai exact, editorul a colectat manuscrisele şi le-a trimis unor specialişti în materie, pentru a le comenta. Conţinutul manuscriselor, rezumatul comentariilor şi răspunsurile autorilor sînt obiectul acestei cărţi.

Mai mult decît ineditul formal al cărţii, ceea ce atrage atenţia este conţinutul tematic, care se referă la probleme ale biologiei teoretice, care în momentul de faţă a atins un nivel de dezvoltare ce îi permite nu numai construcţia şi aplicarea de modele, ci şi pătrunderea, cu propria sa metodologie, în aspectele fundamentale ale biologiei. Dominanta cărţii este problema biogenezei, tratată din punctul de vedere al termodinamicii ireversibile, al teoriei informaţiei şi prin combinarea acestora cu teoria selecţiei. În strînsă legătură cu biogeneza sînt prezentate modele şi încercări de explicare a mecanismelor de evoluţie, homeostazie, excitabilitate, memorie etc.

Comunicările, ca şi discuţiile, se caracterizează printr-un înalt nivel de matematizare şi rigurozitate, cei mai mulţi dintre autori fiind biomatematicieni şi biofizicieni. Este de notat că printre ei întîlnim şi numele unor cercetători români, ale căror lucrări şi intervenţii au fost deosebit de bine apreciate.

Aparţinînd unui domeniu ştiinţific abstract — biologia teoretică — cartea aceasta solicită cititorului cunoştinţe temeinice de fizică, matematică, biologie generală,relevînd încă o dată complexitatea interrelaţiei dintre cele mai diferite discipline.

Constanţa Muşolan
Centrul de Biostructură, Bucureşti

HARALD GÜNTHER, *NMR-Spektroskopie. Eine Einführung* (Spectroscopie RMN. Introducere), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1973, 423 p., 186 fig.

Spectroscopia de rezonanţă magnetică nucleară (RMN) a devenit în ultima vreme o metodă de cercetare a structurii moleculelor din ce în ce mai folosită. Valoarea metodei constă în larga ei aplicabilitate, precum şi în exactitatea datelor analitice pe care le oferă. Cartea de faţă este o introducere în principiile teoretice ale spectroscopiei RMN şi în utilizarea ei în chimia organică.

Primele patru capitole ale volumului expun bazele fizice ale fenomenului de rezonanţă magnetică nucleară, spectrele de rezonanţă ale protonilor din molecula organică, dependenţa de structură a perturbării chimice şi a cuplării spin-spin, detalii de tehnică ale metodei. Capitolele următoare se ocupă de sistematica analizei spectrale RMN : analiza spectrelor de rezonanţă nucleară de înaltă rezoluţie, influenţarea lor de către starea moleculei, de către diverse efecte dinamice etc. Sînt descrise în detaliu cîteva tehnici speciale de spectroscopie RMN : experienţe de dublă rezonanţă, ecou de spin, spectroscopia RMN a moleculelor paramagnetice şi a celor parţial orientate, etc. Dată fiind importanţa izotopilor pentru chimia organică, un capitol special este consacrat combinaţiilor organice ale ^{19}F şi ^{13}C. Volumul are şi un apendix care cuprinde 40 probleme şi rezolvarea acestora, precum

și numeroase date fizice și matematice utile analizei spectrelor RMN. El cuprinde de asemeni un index de subiecte și o listă bibliografică.

Prin stilul său clar și concis, cartea se recomandă ca un bun manual pentru studenți, ca și pentru cei care, prin natura preocupărilor lor, sînt interesați în cunoașterea aprofundată a metodei de spectroscopie de RMN.

Constanța Mușolan
Centrul de Biostructură,
București

Cellular antigens (Antigene celulare), Editor A. Novotny, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1972, 329 pag.

Volumul cuprinde o serie de referate generale consacrate antigenelor celulare care au constituit tema unei conferințe ținute la Philadelphia în iunie 1971.

Cartea este împărțită în 6 părți, și anume : *1*) antigene din bacterii gram negative ; *2*) antigene din bacterii gram pozitive ; *3*) antigene eritrocitare ; *4*) antigene leucocitare ; *5*) antigene din țesuturi normale ; *6*) antigene din țesuturi maligne. Sînt prezentate caracteristicile fundamentale și comportarea antigenelor celulare. Deși sînt discutate în capitole separate, totuși, antigenele bacteriene, eritrocitare și leucocitare, cît și cele din țesuturi normale și maligne, sînt tratate dintr-un punct de vedere unitar. Astfel, pe lîngă rezultatele experimentale obținute — in vivo și in vitro — , este sugerată și semnificația lor clinică. De aici reiese foarte clar contribuția pe care imunologia a adus-o și o va mai aduce la elucidarea bolilor infecțioase.

Fiecare capitol se încheie cu un articol rezumativ ce cuprinde concluziile principale la care s-a ajuns în dezbaterile conferinței. Aceste articole rezumative sînt extrem de folositoare, asigurînd cititorului o privire de ansamblu asupra problemelor dezbătute și punctînd principalele direcții de dezvoltare.

Fiecare articol este însoțit de bogate indicații bibliografice. Un indice de subiecte și unul de autori vin să completeze mijloacele de informare a cititorului.

Cartea se adresează atît cercetătorilor cît și clinicienilor, oferindu-le posibilitatea unei informări rapide și utile asupra problemelor celor mai moderne din domeniul antigenelor celulare.

Doina Onică
Institutul de patologie și genetică
medicală „V. Babeș"
București

Protein-protein interactions (*Interacțiile dintre proteine*) 23 Colloquium der Gesellschaft für Biologische Chemie, 13—15 April, 1972, în Mosbach/ Baden, Edited by R. Jaenicke and E. Melmreich, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1972, 234 fig., 464 p.

Volumul de față cuprinde lucrările unui colocviu dedicat interacțiilor dintre proteine. Aceste lucrări sînt grupate în următoarele capitole : (*1*) structura cuaternară a proteinelor ; (*2*) metode de determinare a complexelor proteice ; (*3*) interacții între proteine eterologe ;

(*4*) complexe proteice din mușchi; (*5*) complexe multienzimatice; (*6*) interacții antigen-anticorp; (*7*) asamblarea spontană; (*8*) interacții intercelulare.

În afară de lucrările grupate sub titlurile de mai sus, cartea mai cuprinde un interesant articol despre forțele moleculare. Celelalte articole se ocupă de organizarea moleculară complexă a organismelor vii, care se bazează pe asocierea diferitelor clase de bio-molecule, adică acizi nucleici, proteine, polizaharide și lipide. Ribozomii, virusurile, complexele enzimatice și sistemele contractile pot fi considerate drept stadii diferite în ierarhia ansamblurilor supramoleculare. Complexitatea interacțiilor dintre bio-molecule devine evidentă la examinarea diferitelor aspecte ale problemei, cum ar fi: relația dintre structură și funcție, în cazul enzimelor alosterice, interacțiile dintre proteine eterologe cu funcții corelate, cum este cazul lanțului enzimatic glicolitic, interacțiile dintre antigene și anticorpi etc.

Fiecare articol este însoțit de bibliografie și de discuțiile purtate la colocviu pe marginea sa.

Noutatea problemelor și modul lor de prezentare fac cartea foarte utilă pentru toți cei care se ocupă cu chimia proteinelor și, mai ales, a enzimelor.

Doina Onică
Institutul de patologie și genetică
medicală „V. Babeș"
București

Cell interactions and receptor antibodies in immune responses (Interacțiuni ale celulelor și anticorpii receptori în răspunsul imun). Proceedings of the third Sigrid Jusélius Symposium, Editor A. Mokela, A. Cross, T. U. Kosunen, London, New York, 1971, 472 pag.

Volumul cuprinde lucrările unui simpozion și, în principal, descrie clasificarea și caracteristicile limfocitelor și interacțiile lor cu alte celule. Capitolele principale ale cărții se referă la: *1*) Prelucrarea și concentrarea antigenelor de către alți factori, în afara celulelor limfoide; *2*) clasele limfocitelor; *3*) existența receptorilor pentru antigen pe limfocitele dependente de timus (T) și independente de timus (B); *4*) reacțiile limfocitelor la stimulare antigenică; *5*) interacția dintre limfocite în răspunsul imun; *6*) mecanismele efectoare care urmează activării limfocitelor. În cadrul fiecăreia dintre părțile enumerate mai sus sînt incluse o serie de articole referitoare la diversele aspecte privind structura și rolul limfocitelor. Fiecare articol este însoțit de numeroase indicații bibliografice. Indicele de subiecte și de autori de la sfîrșitul cărții permit cititorului o mai ușoară informare.

Lucrarea se încheie cu prezentarea unei discuții generale asupra datelor celor mai recente privind celulele formatoare de rozete, stabilitatea antigenului θ drept marker al celulelor T și declanșarea imunității și a toleranței.

Dată fiind noutatea datelor prezentate și sistematizarea lor binevenită, recomandăm lucrarea tuturor celor care se ocupă de probleme de imunitate celulară.

Doina Onică
Institutul de patologie și genetică
medicală „V. Babeș"
București

6. wissenschaftliche Konferenz der Gesellschaft Deutscher Naturforscher und Ärzte, Rottach-Egern 1971 in Conjunction with the Second International Symposium on *Metabolic Interconversion of Enzymes* (A 6-a Conferință științifică a societății naturaliștilor și medicilor germani, Rottach-Egern 1971, în colaborare cu Al doilea Simpozion internațional asupra interconversiei metabolice a enzimelor). Editori: O. Wieland, E. Helmreich, H. Holzer. Springer- Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1972, 227 fig., 448 p.

Volumul cuprinde : o prefață (semnată de editori), indexul autorilor, observațiile de bun venit, adresate de O. Wieland, și 28 de lucrări științifice originale, de o deosebită valoare, semnate de nume de prestigiu ale biochimiei. Dintre acestea, menționăm ca ilustrative pentru actualitatea și importanța problemelor abordate : ,,Interconversia metabolică a enzimelor : Observații introductive" (C. F. Cori), ,,Mecanismul acțiunii AMP-ului ciclic în activarea fosforilazkinazei" (E. G. Krebs, J. A. Beavo, C. O. Brostrom, J. D. Corbin, T. Hayakawa, D. A. Walsh), ,,Mecanismul activării operonului Lac" (G. Zubay), ,,Mecanisme regulatoare ale catabolismului enzimelor" (N. Katunuma, E. Kominami, S. Kominami, K. Kito, T. Matsuzawa), ,,Aspecte moleculare ale reglării complexului piruvat dehidrogenazei din mamifere" (L. J. Reed, T. C. Linn, F. Hucho, G. Namihira, C. R. Barrera, Th. E. Roche, J. W. Pelley, D.D. Randall), ,,Interconversiile metabolice ale enzimelor: Legătura cu răspunsul histeretic" (C. Frieden), ,,De ce sînt interconvertibile enzimele?" (R. H. Haschke, L. Heilmeyer, Jr., E. Helmreich).

Volumul cuprinde și discuțiile purtate la simpozion pe marginea multora din lucrările prezentate cu acest prilej. Fiecare din articolele cuprinse în această carte este însoțit de bibliografia respectivă.

Volumul consemnează în finalul său, discuția generală ce a încheiat simpozionul, condusă de E. R. Stadtman. Ultimele pagini cuprind lista alfabetică a participanților la simpozion și adresele lor.

Problematica — de înaltă ținută științifică a volumului — reprezintă un amplu tablou al eforturilor de stabilire a căilor și mecanismelor de intervenție a enzimelor interconvertibile în procesele de reglare metabolică. Cartea se adresează biochimiștilor și, în special, enzimologilor.

Doina Popov
Centrul de Biostructură
București

Biochemistry and Physiology of Vizual Pigments. Sympozium Held at Institut für Tierphysiologie, Ruhr-Universität Bochum/W. Germany, August 27—30, 1972. (Biochimia și fiziologia pigmenților vizuali. Simpozion ținut la Institutul de fiziologie animală, Universitatea Ruhr din Bochum/Republica Federală Germania Editor Helmut Langer. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1973, 363 p., 202 fig.

Acumularea, în literatura din ultimii ani, a unor date noi și deosebit de valoroase asupra biochimiei și fiziologiei pigmenților vizuali este ilustrată de apariția volumului de față, ce înmănunchează lucrările simpozionului cu această temă, ținut în august 1972 la Universitatea din Bochum.

Volumul cuprinde : o prefață (semnată de Ch. Baumann, S. L. Bonting, K. Hamdorf și H. Langer), lista participanților la simpozion, o prelegere introductivă („Pigmenții vizuali și fiziologia fotoreceptorilor", autor : G. Wald) și 41 de lucrări originale, repartizate în 6 capitole, corespunzător secțiunilor simpozionului. Acestea sînt : cap. I : Structura pigmenților și proprietățile chimice ; cap. II : Fotoliza și intermediarii pigmenților ; cap. III : Regenerarea pigmenților ; cap. IV : Excitarea și adaptarea celulelor fotoreceptoare ; cap. V : Aspecte ionice ale excitării și regenerării ; cap. VI : Enzimologia și arhitectura moleculară a membranei sensibile la lumină.

Dintre articolele componente menționăm ca reprezentative : Conformațiile 11-cis retinalului (W. Sperling) ; Cinetica primelor procese intermediare din fotoliza pigmenților vizuali (E. W. Abrahamson) ; Interrelațiile pigmenților vizuali și „vitaminelor A" la pești și amfibii (C. D. B. Bridges) ; Centrii activi și cercetări enzimologice asupra componenților ciclului vizual (M. Akhtar, S. Amer, M. D. Hirtenstein) ; Energia în funcționarea fotoreceptorilor vertebratelor (W. Sickel) ; Modelul transmiterii interne a excitației vizuale : unele implicații cantitative (R. A. Cone) ; Ultrastructura fotoreceptorilor în retina de bovină (W. T. Mason).

Lucrările cuprinse în volumul de față conturează proprietățile biochimice și biofizice ale pigmenților vizuali ai vertebratelor și nevertebratelor și implicațiile acestora în fiziologia procesului vizual.

Fiecare din lucrările prezentate este însoțită de o listă bibliografică substanțială (cuprinzînd și titlul articolelor) și de discuțiile ce au avut loc la simpozion asupra lucrării respective.

Ca și simpozionul, volumul se încheie cu o discuție generală condusă și prezentată de S. L. Bonting, în care sînt sistematizate descoperirile noi din domeniul biochimiei și fiziologiei pigmenților vizuali, punctîndu-se și cîteva probleme la care nu s-a răspuns pînă în prezent. Ultimele pagini ale volumului cuprind indexul autorilor lucrărilor componente.

Prin specificul problemelor abordate, volumul se adresează tuturor cercetătorilor care se preocupă de elucidarea fenomenelor — atît de captivante și de complexe — ce intervin în procesul vederii.

Doina Popov
Centrul de Biostructură
București

P. CHANDRA, W. APPEL „*Methoden der Molekularbiologie für Biochemiker, Mediziner, und Biologen*" (Metode de biologie moleculară pentru biochimiști, medici și biologi) Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1973, 198 p., 15 fig.

Cuvîntul înainte al volumului de față, redactat de Th. Wieland, și introducerea prezentată de autori, subliniază caracterul de manual de laborator al acestui volum și conturează aplicabilitatea metodelor biologiei moleculare în biologie, medicină și biochimie.

Autorii înmănunchează în cele zece părți componente ale cărții cîteva din metodele cele mai valoroase utilizate în biologia moleculară, precum și unele caracteristici fizice și chimice ale macromoleculelor importante din punct de vedere biologic. Sînt prezentate, astfel, metode de fracționare și purificare a componentelor celulare (cloroplaste, nuclei, ribozomi), metode de microscopie electronică — cu referire specială la microscopia ADN și ribozomilor — metode de autoradiografie, precum și metode de izolare și purificare a ADN, a diferitelor specii de ARN și a cromatinei. Reproducerea tehnicilor respective este ușurată de modul sistematic și concis de

prezentare ; fiecare tehnică cuprinde : principiul metodei, materialele necesare, modul de lucru, indicaţiile de folosire, precum şi bibliografia corespunzătoare.

În capitolele ce cuprind caracteristicile fizice şi chimice ale macromoleculelor se găsesc date valoroase asupra electroforezei în disc a proteinelor, asupra determinării cantitative a ADN, ARN, a proteinelor, analiza bazelor şi a conţinutului de fosfor al acizilor nucleici, analiza secvenţială a unui tripeptid etc.

Un alt capitol este dedicat sintezei enzimatice a macromoleculelor. Sînt menţionate aci date asupra sintezei proteice în sisteme acelulare, sinteza polinucleotidelor cu polinucleotidfosforilază bacteriană etc.

Într-un capitol aparte sînt grupate : producerea şi determinarea interferonului, biosinteza proinsulinei în celule intacte şi determinarea imunologică a insulinei.

Anexa cărţii cuprinde metode de ultracentrifugare, tehnici ce folosesc radioizotopi, precum şi metode fizico-chimice de caracterizare a acizilor nucleici şi proteinelor.

Ultimul capitol cumulează sub formă de tabele proprietăţile cele mai importante ale bazelor purinice şi pirimidinice, ale nucleozidelor purinice şi pirimidinice, ale ADN, ARN, ale amino acizilor şi proteinelor. Fiecare tabelă este însoţită şi de literatura respectivă.

Volumul se încheie cu o listă de 87 indicaţii bibliografice şi cu un index de subiecte.

Conţinutul şi valoarea practică deosebită a acestui manual fac ca acesta să fie de un real folos atît studenţilor cît şi cercetătorilor.

Doina Popov
Centrul de Biostructură
Bucureşti

E. GLADTKE, H. M. von HATTINGBERG, *Pharmakokinetik. Eine Einführung. Mit Beiträgen von W. Kübler, W. H. Wagner und einem Geleitwort von F. H. Dost* (Farmacocinetică. Introducere. Cu contribuţii ale lui W. Kübler şi W. H. Wagner şi cu un cuvînt înainte de F. H. Dost) Springer-Verlag, Berlin – Heidelberg – New York, 1973, 148 p., 69 fig.

Lucrarea de faţă aparţine unui domeniu relativ nou al farmacologiei clinice, farmacoi cinetica, a cărui denumire a fost introdusă în terminologia ştiinţifică în anul 1953 de F. H. Dost. Acesta semnează de altfel şi cuvîntul introductiv al lucrării. Prefaţa şi introducerea volumului constituie pentru autori un prilej de subliniere a obiectului de studiu al farmacocineticii şi a perspectivelor utilizării metodelor specifice acestui domeniu în medicină, biologie şi farmacie.

În cele 10 capitole ale sale, volumul grupează studiul fizico-matematic al fenomenelor de circulaţie a lichidelor biologice – singe sau urină – şi al proceselor legate de concentraţia acestora. Ilustrative în acest sens sînt : Cap. III : „Eliminarea" ; Cap. IV : „Ecuaţia curgerii (Steady-state)" ; Cap. VI : „Farmacocinetică şi terapie" ; Cap. IX : „Folosirea calculatoarelor analoge în farmacocinetică". Cap. VII şi Cap. X sînt redactate de W. Kübler („Farmacocinetica resorbţiei enterale") şi deW. H. Wagner („Experienţe programate pentru farmacocinetică".

Caracteristica lucrării de faţă o constituie îmbinarea armonioasă a fenomenelor biologice cu explicaţia lor fizico-matematică riguroasă. Pe aceste baze, metodele farmacocineticii fac posibilă investigarea circulaţiei şi eliminării unor substanţe străine sau chiar a unora proprii organismului, ca şi realizarea unor valoroase teste de funcţionare a anumitor organe.

După cum precizează autorii, volumul constituie o introducere în farmacocinetică şi un imbold pentru cercetători în abordarea acestui domeniu al farmacologiei. Ultimele pagini cuprind o listă bibliografică, conţinînd şi titlul articolelor şi indexul de subiecte.

Doina Popov
Centrul de Biostructură
Bucureşti

Grundriss der Bindegewebsmassage (Schema masajului ţesutului conjunctiv), Hede Teirich — Leube, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, ed. 6, 1972, 132 pagini, 62 fig.

Masajul ţesutului conjunctiv reprezintă o metodă terapeutică ce se execută la nivelul trunchiului şi al extremităţilor şi a fost descoperită de Elisabeth Dicke în 1934, fiind apoi mult dezvoltată în ultimii ani.

Se descriu zonele de ţesut conjunctiv ale organelor interne, vaselor şi nervilor şi cercetarea lor prin palpare: precizarea acestor zone poate reprezenta un ajutor în stabilirea unui diagnostic de către medicul consultant. Tehnica şi modul de acţiune al acestui tip de masaj sînt descrise amănunţit, cu multe exemplificări.

Metoda a fost utilizată cu rezultate bune în special la o serie de boli interne, de ex. insuficienţă coronariană, hipertrofia muşchiului cardiac, hipertensiune, tulburări ale vezicii biliare după hepatită, afecţiuni gastrointestinale etc.; este de asemenea indicată în chirurgie şi ortopedie, ca şi în unele afecţiuni neurologice.

Volumul interesează în mare măsură pe medici şi fizioterapeuţi în vederea introducerii metodei perfecţionate de masaj printre metodele clinice utilizate în prezent. Bibliografia se găseşte la sfîrşitul volumului, care conţine un index de figuri şi unul de subiecte.

Gabriela Romalo
Institutul Oncologic Bucureşti

Die Erblichen myoklonisch-epileptisch-dementiellen Kernsyndrome (Sindroamele ereditare mioclonice-epileptice-demenţiale), K. Diebold, Springer Verlag, Berlin — Heidelberg — New York, 1973, 254 pag., 31 fig.

Lucrarea se ocupă de nosologia sindroamelor ereditare mioclonice-epileptice-demenţiale, cuprinzînd epilepsia mioclonă progresivă (EMP), dyssynergia cerebellaris myoclonica (DCM) şi variantele mioclonice ale unor tipuri postinfantile de idioţie amaurotică (VMI).

Deoarece incidenţa acestor boli este scăzută, lucrarea studiază toate cazurile citate în literatură, în special cele citate între 1900 şi 1970.

EMP și DCM reprezintă grupuri de boli diferite din punct de vedere biologic; autorul consideră că se pot distinge 3 grupe fundamentale și anume : *1)* 2 tipuri de EMP, a căror trăsătură morfopatologică principală este acumularea intracerebrală de mucopolizaharide, *2)* Tipuri de EMP caracterizate printr-o atrofie a sistemului extrapiramidal — cerebelos. și *3)* Tipuri de DCM și boli similare cu aspecte ereditare diferite. În ceea ce privește clasificarea variantelor VMI, autorul este de părere că sînt necesare o serie de determinări biochimice înainte de a decide dacă acestea sînt tipuri genetic diferite sau nu.

Lucrarea conține date care arată că diagnosticul diferențial între diferite tipuri sau subgrupe de maladii poate fi făcut pe baza caracteristicilor morfopatologice, genetice, clinice și în oarecare măsură a celor biochimice.

Volumul, conținînd o bogată bibliografie și un index de subiecte, se adresează în special psihiatrilor. Biochimia este destul de slab reprezentată, din lipsă de date; acest lucru îl face pe autor să spere că în viitor se va reuși o definire biochimică a acestor sindroame, ceea ce va permite poate aplicarea unui tratament cauzal în vederea compensării efectelor genetice patologice.

Gabriela Romalo
Institutul Oncologic
București

Transplacental carcinogenesis (Carcinogeneza transplacentală), Editori: L. Tomatis, U. Mohr, IARC Scientific Publications Nr. 4, International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, 1973, 181 p.

Volumul cuprinde lucrările unei întruniri organizate la Hanovra, în toamna anului 1971, în vederea analizării riscurilor pe care le prezintă pentru om expunerea prenatală la diferiți agenți chimici, problemă devenită de actualitate de cînd mai multe studii epidemiologice au atras atenția asupra importanței posibile a carcinogenezei transplacentale.

O parte din lucrări s-au ocupat de aspectele biologice ale problemei, și anume s-au prezenta considerații generale asupra problemei, studii comparative asupra carcinogenezei perinatale, studii de carcinogeneză experimentală prenatală, ca și modele experimentale noi ale carcinogenezei transplacentale la șobolan, studii de comportare biologică a tumorilor de șoarece induse pe cale transplacentală; s-a analizat de asemenea sensibilitatea diferențială a embrionului în timpul dezvoltării sale, față de agenți chimici. O mare atenție s-a dat analogiei dintre carcinogeneza transplacentală și teratogeneză; astfel, s-a analizat relația dintre structura chimică și activitate în cele două situații, mecanismul teratogenezei și corelația dintre mutageneză și carcinogeneză, diferite efecte embriotoxice, teratogene și carcinogene ale unor carcinogeni chimici, relația dintre inducerea transplacentală a unor tumori și malformații la șobolanii tratați cu diferite substanțe chimice, ca metilazoximetanolul, nitrozometiluretanul, aflatoxina B, elasiomicina, cicasina etc. S-a arătat că unele substanțe carcinogene provoacă inducerea unor enzime ale sistemului de hidroxilare și că această inducere joacă un rol important în localizarea carcinogenezei.

Un interes cu totul deosebit au stîrnit lucrările lui R Miller, care a adus dovezi epidemiologice despre originea prenatală a cancerului uman; el a prezentat o statistică din care rezultă

că aprox. 90% din fiicele femeilor tratate cu stilbestrol în timpul sarcinei au prezentat o formă particulară de cancer vaginal.

Printre alte recomandații care s-au făcut IARC-ului la încheierea lucrărilor a fost și aceea de a stabili o listă a medicamentelor și substanțelor din mediul ambiant care pot prezenta un pericol carcinogen prenatal la om.

Gabriela Romalo
Institutul Oncologic,
București

Androgene I (Androgeni I), H. E. Voss, G. Oertel, Springer Verlag, Berlin — Heidelberg — New York, 1973, 686 pagini, 171 figuri.

Volumul cuprinde un număr mare de domenii în care cercetarea androgenilor a luat în ultimul timp o mare amploare.

Se descriu în primul rînd structura chimică a androgenilor și a numeroșilor lor derivați, ca și metodele utilizate în determinarea lor. Se face apoi o prezentare a rolului acestor derivați în mecanismul de acțiune al altor hormoni sau al unor organe fără rol hormonal (oase, piele, rinichi, etc). Pe baza acestor date se prezintă, în continuare, o descriere a spectrului de acțiune al androgenilor la om, și se trag concluzii despre utilizarea lor clinică — terapeutică.

O importanță deosebită o prezintă reglarea producerii de androgeni efectuată de către sistemul hipofizar — hipotalamic; din studiul acestei reglări se evidențiază unele căi pentru blocarea sintezei de androgeni și obținerea antiandrogenilor.

O serie de capitole speciale tratează mecanismul de acțiune al androgenilor, redactate pe baza datelor celor mai recente, ca și metodele moderne ale determinării testosteronului — de ex. metoda fixării de proteine și testul radioimun.

Un capitol foarte detaliat este rezervat stadiului actual al cercetărilor privind antiandrogenii, dîndu-se o atenție deosebită ciproteronului și ciproteronacetatului; sînt discutate unele date clinice. Se prezintă de asemenea o serie de substanțe cu structură chimică complet diferită de a androgenilor, dar cu acțiune similară, descoperite recent la unele vertebrate.

Datorită tematicii sale foarte largi, monografia interesează pe biologi și zoologi, chimiști, fiziologi, farmacologi, patologi și clinicieni.

Bibliografia, foarte bogată, este prezentată la sfîrșitul fiecărui capitol; volumul conține un index de autori și unul de subiecte.

Gabriela Romalo
Institutul Oncologic
București

U. WINKLER, W. GER, W. WACKERNAGEL, *Bakterien-, Phagen- und Molekulargenetik* (Genetica bacteriilor şi fagilor; genetica moleculară) Ed. Springer, Berlin — Heidelberg — New York, 1972, 285 pag.

Cartea pe care o prezentăm constituie volumul 1 al unei serii de „lucrări practice de genetică" (Praktikum der Genetik); ea cuprinde o selecţie a unora din tehnicile şi metodele elaborate şi folosite în domeniul geneticii şi al biochimiei microorganismelor, care în ultimele 2 — 3 decenii au condus la aprofundarea cunoaşterii proceselor ce au loc în materia vie, pînă la nivelul lor molecular.

Urmărind introducerea unor astfel de tehnici şi metode în practica învăţămîntului superior şi bazîndu-se pe experimentarea lor cu grupe de studenţi în biologie şi chimie, autorii prezintă materialul din acest volum după cum urmează :

O primă secţiune cuprinde nomenclatura, terminologia, prescurtările şi simbolurile folosite; unele aspecte privind organizarea, aparatura şi materialele necesare efectuării lucrărilor, precum şi unele indicaţii de calculare a rezultatelor.

Cea de a doua secţiune, de fapt cea mai importantă, grupează cele 25 de tehnici şi metode selectate, în 4 subsecţiuni referitoare la : (*a*) — îmbogăţirea în fagi şi ultracentrifugarea, (*b*) — acizii nucleici şi transcrierea, (*c*) — mutaţii şi fotobiologie, (*d*) — traducerea şi recombinarea materialului genetic şi (*e*) — expresii fenotipice. Tehnicile şi metodele selectate sînt tratate sub aspectele lor teoretice, a principiilor care stau la baza lor şi, pe lîngă detalii practice şi experimentale, cuprind indicaţii privind evaluarea rezultatelor şi date bibliografice. Fiecare subsecţiune este însoţită de asemenea, de o serie de exerciţii şi probleme.

Cea de a treia secţiune cuprinde date privind pregătirea mediilor de cultură, a soluţiilor, suşele bacteriene şi fagice, indicaţii referitoare la procurarea chimicalelor şi aparaturii necesare, precum şi la întocmirea protocoalelor experimentale.

Ultima secţiune se referă la rezultatele obţinute prin utilizarea tehnicilor şi metodelor descrise; ea cuprinde totodată rezolvarea exerciţiilor şi problemelor puse pe parcursul secţiunii a doua.

Întregul volum este bine ilustrat cu numeroase scheme, grafice şi tabele.

Considerînd apariţia acestui volum din lucrările practice de genetică moleculară a microorganismelor ca un real succes, sîntem convinşi că el este deosebit de util nu numai pentru studenţii care aprofundează aceste domenii ale biologiei, ci şi pentru cei care organizează instruirea lor sau care folosesc în munca de laborator astfel de tehnici şi metode de cercetare.

S. Vasu
Departamentul de Biochimie
Bucureşti

„Studii şi cercetări de biochimie" publică articole originale, de nivel ştiinţific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici ca : Viaţa ştiinţifică, în care prin note scurte sînt aduse la cunoştinţa cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei : congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experienţă între cercetătorii români şi cei străini etc., Recenzii, în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în ţară şi peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugaţi să înainteze articolele, notele şi recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuş, pe hîrtie de calc. Tabelele şi ilustraţiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planşe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea acelorași date în text, tabele şi grafice. Explicaţia figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de iniţiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanţelor internaţionale.

Autorii au dreptul la un număr de 50 de extrase, gratuit. Responsabilitatea asupra conţinutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondenţa privind manuscrisele, schimbul de publicaţii etc., se va trimite pe adresa Comitetului de redacţie : str. Docenţilor nr. 20, Bucureşti 2, Sectorul I.

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

M. ŞERBAN şi D. COTARIU, **Biochimia contracţiei musculare**, 1970, 240 p., 20,50 lei.

L. DICULESCU, DOINA ONICESCU şi LETIŢIA MISCHIL, **Biologie celulară**, 1971, 420 p., 36 lei.

N. SĂLĂGEANU, **Fotosinteza**, 1972, 243 p., 5 pl., 13 lei.

V. D. MÎRZA şi H. ARAŢEI, **Biomorfologia corticalei ovariene la mamifere**, 1972, 180 p., 2 pl., 8 lei.

P. RAICU, M. IONESCU-VARO, G. GANCEVICI şi GABRIELA MOISESCU, **Celula. Structură, ultrastructură şi funcţii**, 1972, 344 p., 12 pl., 26 lei.

EUGEN MACOVSCHI, **Natura şi structura materiei vii**, 1972, 184 p., 4 pl., 15 lei.

I. V. DEACIUC, **Reglarea celulară a metabolismului glucozei şi acizilor graşi**, 1973, 255 p., 10,50 lei.

BIBLIOTECA

La revue „Studii şi cercetări de biochimie" parait 4 fois par an. Le prix d'un abonnement annuel est de $ 5 —. Toute commande à l'étranger sera adressée à Întreprinderea Rompresfilatelia, Boîte postale 2001, telex 011631, Bucarest, Roumanie, ou à ses représentants à l'étranger. En Roumanie, vous pourrez vous abonner par les bureaux de poste ou chez votre facteur.

ST. CERC. BIOCHIM., TOMUL 17, NR. 1, P. 1—118, BUCUREŞTI, MARTIE, 1974

I. P. „Informaţia" — c. 3597

43316

Lei 20.—

F 1330

studii şi cercetări de biochimie

2

TOMUL 17

1974

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochim., tomul 17, nr. 2, p. 119–236, Bucureşti, iunie 1974

SCBIAS – 17 (2), 119–236 (1974)

COMITETUL DE REDACŢIE

Redactor responsabil:

Academician E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUŞANSCHI

Membri:

S. OERIU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; TR. RĂDULESCU; VICTORIA ALEXANDRESCU

Secretar de redacţie:

VICTOR GHEŢIE

Revista apare de 4 ori pe an.

Preţul unui abonament anual este de 80 lei.

În ţară abonamentele se fac la oficiile poştale, agenţiile poştale, factorii poştali şi difuzorii voluntari din întreprinderi şi instituţii. Revista se poate procura (direct sau prin poştă) şi prin PUNCTUL DE DESFACERE din cadrul Editurii Academiei.

Orice comandă din străinătate (numere izolate sau abonamente) se face prin Întreprinderea Rompresfilatelia, Căsuţa poştală 2001 — telex 011631, Bucureşti, România, sau prin reprezentanţii săi din străinătate.

Manualele, cărţile şi revistele pentru schimb, precum şi orice corespondenţă, se vor trimite pe adresa Comitetului de redacţie al revistei „Studii şi cercetări de biochimie": Bucureşti, str. Docenţilor, nr. 20, sectorul 1.

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA
Bucureşti, str. GUTENBERG nr. 3 bis, sectorul 6

STUDII ŞI CERCETĂRI DE
BIOCHIMIE

Tomul 17, nr. 2 1974

SUMAR

G. BENGA, Fracţionarea subcelulară a ţesutului hepatic uman. I. Izolarea fracţiunii mitocondriale 123

I. F. DUMITRU, D. IORDĂCHESCU, S. NICULESCU, G. FILIPESCU, E. BĂLTEANU, Influenţa raportului efector—substrat asupra comportamentului pirofosfat fosfohidrolazei din ficatul de şobolan. 137

E. GOINA, M. KEREKES, Adsorbţia pe hîrtie de filtru a unor proteine globulare denaturate 145

I. HURGHIŞIU, D. PARASCHIVESCU, Cercetări comparative asupra aminoacizilor liberi la diferite specii de formicide, sănătoase şi în faza de tetanie 149

M. IONESCU, Asupra degradării anaerobe a amidonului şi celulozei 157

V. JURCA, Acţiunea molibdenului asupra activităţii unor enzime din ficat la păstrăvul curcubeu (*Salmo gairdneri*) 165

V. JURCA, C. MATEI, D. MATEI, Studiul comparativ al proteinelor din serul sanguin la unele specii şi linii de ciprinide 171

M. KEREKES, A. KOVÁCS, Adsorbţia pe hîrtie de filtru a proteinelor . . . 177

GH. LEPORDA, C. HALLER, S. FREUND, L. ABABEI, Modificări respiratorii şi glicolitice în miocardul şobolanilor cu un supliment de gălbenuş de ou la regimul de creşcătorie şi sensibilizaţi în prealabil cu vitamină D_2 185

A. POPESCU, M. FĂRCASIU, L. CROITORESCU, Efectul dezechilibrului aminoacidic din raţia alimentară asupra unor enzime hepatice 195

D. STEFĂNESCU, A. CONSTANTINESCU, Contribuţii la dovedirea formării aminoacizilor înaintea apariţiei vieţii pe pămînt. Obţinerea unor aminoacizi din metan, amoniac şi apă prin descărcări electrice de înaltă frecvenţă 205

REFERAT GENERAL

E. GANEA, Aspecte biochimice privind structura şi metabolismul colagenului 209

RECENZII 223

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

BIOCHIMIE

Tomul 17, no 2 1974

CONTENTS

G. BENGA, Subcellular fractionation of human liver. I. Isolation of the mitochondrial fraction 123

I. F. DUMITRU, D. IORDĂCHESCU, S. NICULESCU, G. FILIPESCU, E. BĂLTEANU, The influence of the substrate-effector ratio upon the behaviour of pyrophosphate phosphohydrolase of rat liver 137

E. GOINA, M. KEREKES, Adsorption behaviour of some denatured globular proteins on filter paper 145

I. HURGHIŞIU, D. PARASCHIVESCU, Comparative investigations on free aminoacids in different species of ants, healthy and in tetany phase . 149

M. IONESCU, On the anaerobic degradation of starch and cellulose 157

V. JURCA, The action of molybdenum upon the activity of some enzymes in trout (*Salmo gairdneri*) liver 165

V. JURCA, C. MATEI, D. MATEI, Comparative study of the serum proteins in some species and lines of Cyprinidae 171

M. KEREKES, A. KOVÁCS, Adsorption of proteins on filter paper 177

GH. LEPORDA, C. HALLER, S. FREUND, L. ABABEI, Respiratory and glycolytic changes in myocardium of rats fed on a farm diet supplemented with egg yolk and previously sensitized with D_2 vitamin 185

A. POPESCU, M. FĂRCAŞIU, L. CROITORESCU, The effect of dietary amino acid imbalance on some liver enzymes 195

D. ŞTEFĂNESCU, A. CONSTANTINESCU, Contributions supporting the formation of amino acids prior to the appearance of life on the earth. Obtainment of some amino acids from methane, ammonia and water by high frequency electric discharges 205

REVIEW

E. GANEA, Biochemical aspects on the collagen structure and metabolism . 209

BOOK REVIEW 223

STUDII ŞI CERCETĂRI DE
BIOCHIMIE

Tomul 17, no 2 1974

CONTENTS

G. BENGA, Subcellular fractionation of human liver. I. Isolation of the mitochondrial fraction 131
I. E. OUMITRU, D. IOROŞCHESCU, S. NICULESCU, G. FILIPESCU, E. BĂLTEANU, The influence of the substrate-effector ratio upon the behaviour of pyrophosphate phosphohydrolase of rat liver 137
E. GOINA, M. KERERES, Adsorption behaviour of some denatured globular proteins on filter paper 145
I. HURGHIŞIU, D. PARASCHIVESCU, Comparative investigations on free aminoacids in different species of mits, healthy and in tetany phase 149
M. IONESCU, On the anaerobic degradation of starch and cellulose 157
V. JURCA, The action of molybdenum upon the activity of some enzymes in trout (*Salmo pilchardi*) liver 165
V. JURCA, G. MATEI, D. MATEI, Comparative study of the serum proteins in some species and lines of Cyprinidae 171
M. KERERES, A. KOVACS, Adsorption of proteins on filter paper 177
GH. LEPORDA, C. HALLER, S. FREUND, L. ABAREI, Dysentery and glycolytic changes in myocardium of rats fed on a farm diet supplemented with egg yolk and previously sensitized with D_2 vitamin 183
A. POPESCU, M. FĂRCAŞIU, L. GROTTORESCU, The effect of nicotinic amino acid imbalance on some liver enzymes 195
D. ŞTEFĂNESCU, A. CONSTANTINESCU, Contributions supporting the formation of amino acids prior to the appearance of life on the earth. Obtainment of some amino acids from methane, ammonia and water by high frequency electric discharges 201

REVIEW

E. GANEA, Biochemical aspects on the collagen structure and metabolism 205

BOOK REVIEW 223

ST. CERC. BIOCHIM., 17, 2, 123–135 (1974)

FRACȚIONAREA SUBCELULARĂ A ȚESUTULUI HEPATIC UMAN

I. IZOLAREA FRACȚIUNII MITOCONDRIALE

GHEORGHE BENGA

Rezumat. — Se descrie un procedeu reproductibil de izolare a fracțiunii mitocondriale din ficatul uman (din fragmente mici de țesut prelevate prin biopsie intraoperatorie). Separarea mitocondriilor din țesutul hepatic uman prezintă particularități față de izolarea din alte surse. Transportul țesutului de la sala de operație pînă în laborator trebuie să se facă sub formă de țesut întreg și nu sub formă de omogenat. La bolnavii hepatici poate apare o inhibiție a primei etape a lanțului respirator sub influența anesteziei. Adausul albuminei serice degresate (1% concentrație finală) la mediul de incubare și de izolare a dus la obținerea unor valori mai mari ale consumului de oxigen și ale controlului respirator. Prin sedimentarea mitocondriilor la o forță centrifugală mai mică este micșorată contaminarea cu microzomi și lizozomi, deși scade și randamentul de obținere a mitocondriilor. S-au analizat factorii care influențează valorile consumului de oxigen în cazul stabilirii valorilor de referință pentru modificările patologice. Activitatea citocromoxidazei din mitocondriile izolate din ficatul uman a fost mai mică decît cea din ficatul de șobolan și de iepure, ceea ce denotă particularități ale etapei finale a lanțului respirator în mitocondriile din ficatul uman. Raportarea activităților enzimatice trebuie să se facă la proteina mitocondrială dozată prin metoda Lowry, care este cea mai sensibilă și estimează proteina „funcțională" din parenchimul hepatic.

Dintre modalitățile de investigare a metabolismului celular, studiul direct, pe fragmente de țesut, reprezintă o modalitate mai valoroasă decît cel indirect (determinarea activității enzimelor și a nivelului unor metaboliți în lichidele biologice). Cercetările pe țesuturi se pot efectua pe secțiuni de țesut, pe omogenate sau pe fracțiuni subcelulare izolate. În cazul ficatului uman, rezultatele obținute pe omogenate sînt foarte contradictorii, după cum rezultă dintr-o recentă trecere în revistă (1). Reiese interesul pe care îl prezintă fracționarea subcelulară a țesutului hepatic uman și caracterizarea structurală și funcțională a organitelor izolate.

Față de importanța cercetărilor pe mitocondrii, surprinde numărul mic de lucrări consacrate mitocondriilor izolate din ficatul uman (2–6). Această situație se explică prin dificultățile pe care le prezintă obținerea unei fracțiuni mitocondriale pure, cu integritatea păstrată, ca și cele legate de necesitatea efectuării investigațiilor pe o cantitate mică de țesut, obținută din clinică.

În lucrarea de față se descrie un procedeu reproductibil de preparare a fracțiunii mitocondriale din cantități mici de țesut hepatic uman și se analizează particularitățile pe care le prezintă izolarea mitocondriilor din probele recoltate prin biopsie chirurgicală. Sînt prezentate activitățile enzimatice ale mitocondriilor din ficatul uman, în condiții fiziologice.

MATERIAL ȘI METODE

Material biologic. Țesutul hepatic uman a fost prelevat de la bolnavii operați în Clinica chirurgicală Cluj pentru diferite afecțiuni abdominale (ulcere gastrice sau duodenale, colecistite, litiaze biliare, ictere de etiologie diferită). Anestezia s-a efectuat după următoarea schemă : preanestezie cu morfină sau analogi, apoi în cursul operației o combinație de hexobarbital sodic (Pentothal), protoxid de azot, halotan (2-bromo-2-cloro-1, 1, 1-trifluoroetan) sau pentran (2,2-dicloro-1,1-difluoroetil metil eter) și curarină. Imediat după deschiderea cavității peritoneale s-au plasat două fire de catgut în jurul unei porțiuni aflate pe marginea anterioară a lobului stîng hepatic. S-a prelevat un fragment de țesut de formă triunghiulară, cu vîrful posterior, în greutate de 0,5—1 g, apoi s-au strîns cele două fire de catgut, astfel că nu s-a produs nici o hemoragie ori scurgere a bilei. O parte din fiecare fragment s-a utilizat pentru examenul anatomo-patologic. Acest procedeu s-a utilizat la circa 100 pacienți, fără nici o complicație.

Influența anesteziei și a stressului operator a fost urmărită recoltînd prima biopsie imediat după deschiderea cavității abdominale și a doua după 1—3 ore de anestezie. Cele două fragmente s-au recoltat din același loc și au avut pe cît posibil dimensiuni egale. S-au ales atît subiecți cu ficatul normal, clinic și la examinările de laborator (hernie ombilicală, ulcere gastrice și duodenale), cît și bolnavi cu suferință hepatică secundară unei colecistopatii, cu hepatită cronică sau icter mecanic prin litiază biliară.

Pentru determinările pe animale s-au folosit iepuri de rasă Chinchilla, în greutate de 3,0—3,5 kg și șobolani albi.

Prepararea mitocondriilor din ficatul de șobolan și de iepure. Șobolanul este sacrificat printr-o lovitură pe cap și decapitare, apoi se prelevează rapid ficatul. Iepurii sînt sacrificați prin embolie gazoasă, produsă prin injectarea i.v. a 10 ml aer. Țesutul hepatic este introdus într-o soluție de zaharoză 0,25 M, Tris-HCl[1] 10 mM (pH 7,4), EDTA 2 mM, aflată la 2°C. După răcirea țesutului, acesta se mărunțește cu foarfeca, se spală cu aceeași soluție pentru îndepărtarea sîngelui, apoi se înlătură capsula și țesutul conjunctiv și se omogenizează în aceeași soluție, folosind un omogenizator de tip Potter-Elvehjem (de sticlă cu pistil de teflon), acționat la 1500 rot/min, în mai multe reprize de cîte 30 s (cu pauze de aceeași durată), pentru a evita încălzirea. Se obține un omogenat cu o concentrație finală de țesut de 10—20%. Izolarea mitocondriilor se face prin metoda Schneider-Hogeboom (7), iar în final sedimentul se suspendă în zaharoză

[1] S-au folosit următoarele prescurtări : AGL = acizi grași liberi ; Tris = trihidroximetilaminometan ; EDTA = acid etilendiaminotetraacetic ; rot/min = rotații pe minut ; QO_2 = consum de oxigen ; C.A. = control acceptor ; HbO_2 = oxihemoglobină.

75 mM, manitol 225 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 7,4), la o concentrație proteică de 40—50 mg/ml. Toate operațiile se fac la 0—4°C.

Prepararea mitocondriilor din ficatul uman. Fragmentul de țesut recoltat prin biopsie trebuie transportat de la sala de operație pînă în laborator. Deoarece aceasta necesită 15—30 min, s-a urmărit cel mai adecvat procedeu de transportare. În principiu, sînt posibile două procedee de transportare : sub formă de omogenat, sau sub formă de țesut întreg. Transportul sub formă de țesut întreg este mai bun decît cel sub formă de omogenat, consumul de oxigen fiind mai mare în primul caz.

În laborator fragmentul de țesut este cîntărit rapid, mărunțit cu foarfeca, îndepărtînd capsula, vasele sanguine și țesutul conjunctiv, și spălat în soluție de zaharoză 250 mM, Tris-HCl 10 mM, EDTA 2 mM. Omogenizarea se face în același mod ca pentru ficatul de șobolan, dar în mediul de omogenizare se adaugă albumină serică degresată în concentrație finală de 1%.

Mărimea forței centrifugale și timpul de centrifugare pentru separarea mitocondriilor prezintă importanță mare. Omogenatul a fost centrifugat la 600 g timp de 10 min pentru îndepărtarea nucleilor, iar supernatantul rezultat a fost utilizat la separarea mitocondriilor. Sedimentarea fracțiunii mitocondriale s-a realizat comparativ la 5 500 g și la 12 000 g timp de 10 min. Sedimentele mitocondriale au fost spălate de două ori în zaharoză 250 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 7,4), albumină serică degresată 1% și centrifugate de fiecare dată cîte 10 min la turațiile de mai sus. În final au fost resuspendate în zaharoză 75 mM, manitol 225 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 7,4) la o concentrație proteică de cca. 20 mg/ml.

Măsurarea consumului de oxigen și a controlului acceptor s-a făcut prin metoda spectrofotometrică descrisă de Bârzu și colab. (8, 9), adaptată la cantități mici de țesuturi (10). Măsurătorile au fost efectuate la 430 nm, la 37°C, în cuvă de 0,3 cm (drumul razei de lumină), cu spectrofotometrul VSU—1, C. Zeiss—Jena. Mediul de reacție conține la volum final de 1 ml : 180 mM zaharoză, 50 mM KCl, 16 mM Tris-HCl (pH 7,4), 2,5 mM EDTA, 2,5 mM $MgCl_2$, 5 mM tampon fosfat (pH 7,4), 10 mM NaF, 0,5 mg hexokinază (NBC, 1 mg = ca. 3,7 EU), 56 mM glucoză, 10 mg albumină și 0,04 mEq HbO_2.

Controlul respirator a fost măsurat sub forma controlului acceptor (C.A.) egal cu raportul dintre consumul de oxigen după adăugarea ADP și consumul de oxigen inițial, înainte de adăugarea ADP.

Calculul consumului de oxigen măsurat spectrofotometric s-a făcut pe baza corespondenței dintre creșterea extincției și rata respiratorie, după formula (știind că 2 μAtomi oxigen corespund la 1 μEq hemoglobină) QO_2 (n Atomi pe probă)$=2\ V.f.\ \Delta E/81.d$, unde V reprezintă volumul de reacție (ml), d drumul razei de lumină (cm) și f un factor de corecție care depinde de concentrația hemoglobinei și sursa mitocondriilor (11).

Măsurătorile manometrice ale consumului de oxigen s-au făcut după tehnica clasică Warburg, descrisă de Slater (12). S-a lucrat la 37°C, la un volum final de 2 ml, concentrația reactivilor fiind aceeași ca în cuva spectrofotometrică.

Determinarea activităților enzimatice. Dozarea *fosfatazei acide* (EC 3.1.3.2.) s-a făcut determinînd fosfatul anorganic eliberat din β-glicero-

fosfat de Na la 37°C în timp de 30 min. Mediul de incubare (volum final 0,5 ml) conţinea: tampon acid acetic-acetat 0,1 M (pH 5,0) substrat (β-glicerofosfat de Na) 50 mM şi 0,2—0,3 mg proteină mitocondrială. Activitatea fosfatazei s-a exprimat în nanomoli de substrat hidrolizat per minut şi per mg de proteină mitocondrială. Activitatea *glucozo-6-fosfatazei* (E C 3.1.3.9) s-a determinat măsurînd fosfatul anorganic eliberat din glucozo-6-fosfat la 37°C în 20 minute. Mediul de incubare (volum final 0,5 ml) conţinea: tampon Tris-maleat 25 mM (pH 6,0) glucozo-6-fosfat 25 mM şi 0,2—0,4 mg proteină mitocondrială. Activitatea enzimei s-a exprimat în nanomoli de substrat hidrolizat per minut şi per mg de proteină mitocondrială.

Citocromoxidaza (E C 1.9.3.1) s-a determinat spectrofotometric la 550 nm, după metoda Smith şi Camerino (13,14). Activitatea enzimatică a fost exprimată prin constanta de viteză a reacţiei de ordinul 1 de oxidare a fericitocromului c ($min^{-1}.mg$ $proteină^{-1}.ml$).

Purificarea oxihemoglobinei. Se recoltează sînge uman pe citrat de Na 3,2% (18 ml citrat şi restul pînă la 100 sînge). Hematiile se separă prin centrifugare la 3000 rot/min timp de 15 min, iar plasma se îndepărtează prin aspirare la trompă. Sedimentul se spală cu o soluţie de NaCl 0,9% şi se centrifughează iar la 3000 rot/min timp de 15 minute. Se spală apoi de 3 ori sedimentul cu o soluţie de $AlCl_3$ 0,0025 M, NaCl 1,2% şi se centrifughează de fiecare dată la 3000 rot/min 15 minute. Se îndepărtează supernatantul la trompă. Se măsoară apoi volumul sedimentului într-un cilindru gradat, se adaugă un volum egal de apă bidistilată şi toluen (amestec în proporţia 0,4 ml toluen la 1 ml apă). Se agită puternic, după care se lasă 18 ore la 4°C. Se centrifughează apoi hemolizatul 20 min la 4000 g pentru îndepărtarea stromei şi a stratului toluenic. Stroma sedimentează, iar stratul toluenic se ridică la suprafaţă. Stratul apos intermediar se dializează 20 ore faţă de o soluţie saturată de sulfat de amoniu. Precipitatul depus pe sacul de dializă se redizolvă într-un volum cît mai mic de apă bidistilată şi se dializează faţă de apă bidistilată la 0°C, pînă la reacţia negativă pentru SO_4^{2-} şi Cl^-. Se centrifughează încă o dată 20 minute la 4000 g pentru îndepărtarea eventualelor urme de stromă, apoi supernatantul clar se aduce la o concentraţie de 2 mEq HbO_2/l şi se înfiolează în volume de cîte 1 ml. Acestea se păstrează la —10° cel mult o lună. Dozarea oxihemoglobinei se face după metoda spectrofotometrică, cunoscînd coeficientul molar de extincţie al hemoglobinei la 576 nm. 20 µl soluţie hemoglobină se diluează cu apă la 1,5 ml şi se citeşte extincţia în cuvă de 1 cm la 576 nm: HbO_2 (mEq/l) = $4{,}87 . E_{576}$.

Alte procedee. Degresarea albuminei serice pentru mediul de incubare este necesară datorită urmelor de acizi graşi pe care le conţin preparatele comerciale. Toate operaţiile se fac la temperatura de —5°C (amestec refrigerator de gheaţă cu sare), pentru a preveni denaturarea serumalbuminei. O cantitate de 500 mg albumină serică bovină cristalizată se spală de 3—4 ori cu etanol absolut, centrifugîndu-se după fiecare spălare timp de 10 min la 3000 rot/min. Sedimentul final se dizolvă în Tris-HCl 1 mM (pH 7,4), în volumul minim necesar pentru dizolvare şi se dializează timp de 24 ore la 4°C faţă de Tris-HCl 1 mM. După dializă se aduce la 5 ml cu Tris-HCl 1 mM. Se păstrează la —10°C timp de cîteva luni. Pentru mediul de izolare a mitocondriilor s-a utilizat o soluţie de albumină

serică bovină preparată la Institutul „I. Cantacuzino" București (concentrație aproximativă 10%) sau o soluție de albumină serică umană 20% (preparat injectabil pentru transfuzii). Se precipită cu etanol la −5°C o cantitate de 10 ml soluție de albumină. Se centrifughează la 3000rot/min timp de 10 minute, iar sedimentul se spală de 3—4 ori cu etanol absolut și se prelucrează ca și albumina cristalizată.

Dozarea fosfatului anorganic s-a făcut după metoda Lowry și Lopez (15). Dozarea proteinelor s-a făcut prin metoda Gornall (16), metoda Lowry (17) și prin metoda Kjeldahl, descrisă de Manta și Ciplea (18).

REZULTATE

Particularitățile preparării mitocondriilor din ficatul uman. Faptul că sedimentarea mitocondriilor la o forță centrifugală mai mică (5 500 g) reduce contaminarea cu lizozomi și microzomi, deși scade și randamentul de obținere a mitocondriilor, se observă din tabela 1, în care s-a luat ca marker pentru lizozomi fosfataza acidă și glucozo-6-fosfataza pentru microzomi.

Tabela 1

Contaminarea cu lizozomi și microzomi a fracțiunii mitocondriale sedimentată la două forțe centrifugale.

Fracțiunea	Exp.	Fosfataza acidă (nanomoli substrat/min/mg prot.)	Glucozo-6-fosfataza (nmoli substrat/min/mg proteină)	Randamentul de obținere a mitocondriilor (mg/g țesut umed)
Omogenatul total	1	5,6	16,5	
	2	4,6	13,2	
Mitocondrii sedimentate la 5500 g	1	2,3	3,4	6,9
	2	1,9	3,4	6,5
Mitocondrii sedimentate la 12000 g	1	2,7	5,3	9,5
	2	2,1	5,0	8,9

În privința influenței anesteziei, studiată prin prelevări de țesut hepatic la începutul și sfîrșitul operației, la subiecții cu ficatul normal nu am constatat nici o diferență între activitatea respiratorie a mitocondriilor izolate din prima și a doua biopsie, chiar în cazul unei narcoze prelungite (tab. 2). La bolnavii hepatici am observat un consum de oxigen mai mic cu substratele NAD-dependente în cazul mitocondriilor izolate din a doua biopsie, în timp ce respirația cu succinat avea valori apropiate la cele două prelevări (cu o excepție, exp. nr. 65, tab. 3).

Activitățile respiratorii ale mitocondriilor din ficatul uman. S-a determinat consumul de oxigen al mitocondriilor cu substrate NAD-dependente și cu succinat, în absența și în prezența ADP (respectiv în stările 4 și 3 ale mitocondriilor). Determinările paralele prin metoda spectrofotometrică și prin manometrie Warburg au dat rezultate similare, la o compoziție identică a mediului de respirație (tabela 4).

Tabela 2

Activitatea mitocondriilor din ţesutul hepatic prelevat la începutul (coloana *A*) şi sfîrşitul operaţiei (coloana *B*) la subiecţi cu ficatul normal. Intervalul între cele două prelevări a fost de 2 ore, anestezia s-a efectuat cu pentran.[a)]

Substratul	Exp. nr.	Consum de oxigen[b)] (nAtomi/min/mg proteină)		Control acceptor[c)]	
		A	*B*	*A*	*B*
Succinat	56	105	—	2,2	
	57	75	97	1,8	1,5
Glutamat	56	29	31	2,2	2,3
	57	27	27	1,0	1,4
Izocitrat + malat	56	43	44	2,0	1,4
	57	43	36	2,6	1,8

a) Condiţiile experimentale sînt descrise în text.

b) În prezenţa ADP (0,2 mM).

c) Calculat ca raportul dintre respiraţia în prezenţă de ADP (starea 3 a mitocondriilor) şi înainte de adausul ADP (starea 4).

Tabela 3

Activitatea mitocondriilor din ţesutul hepatic prelevat la începutul (coloana *A*) şi sfîrşitul operaţiei (coloana *B*) la hepatici.[a)]

Substratul	Exp. nr.	Consum de oxigen[b)]		Control acceptor	
		A	*B*	*A*	*B*
Succinat	47	105	101	5,9	6,1
	48	23	31	7,2	5,7
	60	75	101	3,8	3,2
	65	63	20	3,7	2,0
Glutamat	47	23	14	1,6	1,7
	48	5	3	2,4	2,4
	50	28	25	1,5	1,8
	60	19	7	2,9	1,4
Piruvat + malat	47	21	15	2,4	1,5
	48	3	2	1,8	2,0
	58	23	17	1,6	1,1
	60	10	16	2,4	4,1
	65	11	9	3,2	1,4
α-cetoglutarat+malat	47	23	20	1,3	1,8
	48	7	2	4,0	1,0
	58	25	23	1,0	1,3
	60	11	6	1,5	1,0
	65	7	4	1,4	1,2

a) Condiţiile experimentale sînt descrise în text.

b) nAtomi/min/mg proteină, în prezenţă de ADP (0,2 mM).

Adausul albuminei serice degresate în mediul de preparare şi de incubare a dus la obţinerea unor valori mai mari ale consumului de oxigen şi ale controlului respirator (fig. 1). Dintre substrate succinatul a fost oxidat cel mai puternic, iar dintre substratele NAD-dependente consumul de oxigen maxim a fost înregistrat cu izocitrat-malat, iar cel minim cu

Tabela 4

Consumul de oxigen al mitocondriilor din ficatul uman măsurat comparativ prin manometrie și spectrofotometric.[a)]

Substratul	Exp. nr.	Consum de oxigen (nAtomi/min/mg prot.)	
		Măsurat manometric	Măsurat spectrofotometric
Succinat	1	118	121
	2	107	103
	3	98	101
Glutamat	1	43	40
	2	36	41
	3	52	50

a) Condițiile experimentale sînt descrise în text.

piruvat-malat. Dealtfel consumul de oxigen cu piruvat-malat a fost primul și cel mai puternic scăzut în cazul afecțiunilor hepatice. Controlul acceptor a fost bun, avînd valori de peste 3 cu toate substratele. Fracțiunea mitocondrială și-a păstrat activitățile respiratorii puțin modificate timp de 3 ore după izolare, ceea ce este important, fiindcă efectuarea determinărilor necesită un interval de timp, în care apariția unor modificări ar duce la rezultate eronate.

La stabilirea valorilor normale ale consumului de oxigen pentru mitocondriile izolate din ficatul uman trebuie să se țină seama de faptul că compoziția mediului de incubare influențează foarte mult respirația mitocondriilor. După cum se observă în tabela 5, adausul hexokinazei

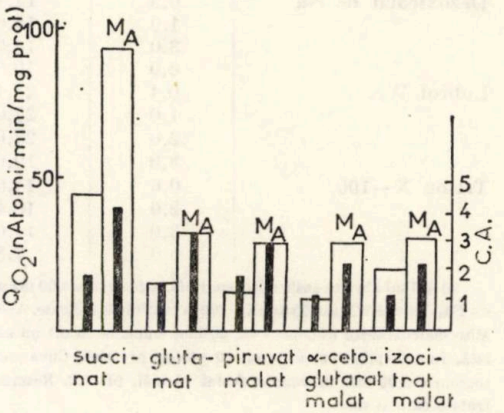


Fig. 1. — Efectul protector al albuminei asupra activității respiratorii a mitocondriilor izolate din ficatul uman.

M_A — mitocondrii izolate în albumină 1%; coloanele fără indice reprezintă activitatea mitocondriilor izolate fără albumină; coloanele pline reprezintă controlul acceptor. Consumul de oxigen este exprimat în nAtomi/min/mg proteină. Valorile reprezintă media a 5 experiențe.

și a glucozei stimulează respirația, în timp ce fluorura o inhibă. La concentrații mai mari de ADP, consumul de oxigen este și el mai mare.

Activitatea citocromoxidazei. După Smith și Camerino (14) la determinarea citocromoxidazei trebuie găsite condițiile optime pentru a obține o activitate maximă. De aceea s-au încercat diferite concentrații ale detergenților folosiți la lizarea mitocondriilor, pe ficat de șobolan, iepure și pe ficat uman. S-a găsit activitatea maximă la o concentrație de dezoxi-

Tabela 5

Influența mediului de incubare asupra consumului de oxigen și asupra controlului respirator al mitocondriilor izolate din ficatul uman.[a)]

Substrat	Adausuri: Hexokinază+glucoză	Adausuri: NaF (10 mM)	ADP 0,3 mM	ADP 1,2 mM	C.A.[c)]
Succinat	+	−	134,0±5,6[b)]	151,0±7,8	6,2±0,4
	−	−	102,6±7,5		6,1±0,3
	+	+	123,0±6,8		
Piruvat+malat	+	−	53,1±2,3	67,1±3,6	5,0±0,3
	−	−	30,2±2,0		4,5±0,2
	+	+	32,7±1,8		
Izocitrat+malat	+	+	60,2±2,6	76,5±5,7	5,6±0,6
	−	−	46,6±1,7		5,0±0,3
	+	+	50,4±2,0		

a) Condițiile experimentale sînt descrise în text.

b) Media și eroarea standard a mediei calculate pentru 6 experiențe.

c) Controlul acceptor este calculat ca raportul dintre consumul de oxigen în prezență de 0,3 mM ADP și consumul de oxigen înainte de adausul ADP. Valorile consumului de oxigen sînt exprimate în nAtomi/min/mg proteină mitocondrială.

Tabela 6

Efectul detergenților asupra citocromoxidazei din mitocondriile izolate din ficatul de șobolan, iepure și uman. Activitatea este exprimată în constanta de ordinul 1 (min^{-1} . mg proteină$^{-1}$ ml).[a)]

Detergentul	Concentrația (mg detergent/mg proteină)	Ficat de șobolan	Ficat de iepure	Ficat uman
Dezoxicolat de Na	0,3	14,4	3,4	1,5
	1,0	15,6	3,0	1,4
	3,0	14,0	2,9	1,2
	6,0	10,0	2,5	0,8
Lubrol WX	0,4	23,4	8,2	1,3
	1,0	27,0	11,0	1,0
	2,0	27,0	9,2	1,4
	8,0	19,6	10,6	1,0
Triton X−100	0,6	14,0	3,2	0,2
	2,0	16,4	4,1	0,2
	3,0	14,0	4,1	0,1
	5,0	7,8	1,2	0,1

a) 0,1 ml din suspensia mitocondrială, care conținea 20 mg proteină/ml au fost tratați cu dezoxicolat de Na, Lubrol WX sau TritonX−100 în cantitățile indicate. Apoi organitele lizate s-au diluat cu apă la 2 ml. Mitocondriile lizate osmotic s-au obținut adăugînd la 0,1 ml suspensie mitocondrială 3,9 ml apă bidistilată. În determinări s-au folosit 10−40 µg proteină. Cuva spectrofotometrului conținea 0,5 ml ferocitocrom c 0,05 mM în tampon fosfat 75 mM, pH 7,2. Reacția s-a pornit prin adăugarea mitocondriilor tratate ca mai sus.

colat de Na de 1 mg/mg proteină, Triton X−100 2 mg/mg proteină și Lubrol WX 1 mg/mg proteină. De asemenea s-a observat o activitate foarte scăzută a mitocondriilor din ficatul uman în prezența Tritonului, față de activitatea mai mare cu dezoxicolat, în timp ce în cazul mitocondriilor din ficatul de șobolan și de iepure Lubrolul s-a dovedit cel mai eficace detergent. În absența detergenților, mitocondriile fiind lizate prin șoc osmotic, s-a obținut activitatea maximă în cazul mitocondriilor de șobolan și din ficatul uman (tabela 6).

Raportarea activităților enzimatice. Stabilirea unei baze de referință pentru activitățile enzimatice este o problemă importantă în studiile pe organite celulare, în special pe mitocondrii. Dintre metodele de referință: per mg de țesut proaspăt ori uscat (19,20), per mg de proteină, per azot necolagenic ori total (21), cea mai utilizată este raportarea la proteina mitocondrială. Pentru a stabili care metodă este adecvată dozării proteinelor din mitocondriile din ficatul uman, am efectuat determinări comparative prin metoda Gornall, metoda Lowry și prin dozarea azotului proteic prin metoda Kjeldahl. Aceste trei metode au fost aplicate și pe mitocondriile din ficatul de șobolan. După cum se observă din figura 2 în cazul mitocondriilor din ficatul de șobolan se constată o bună concordanță în conținutul proteic prin toate cele trei metode. În cazul mitocondriilor din ficatul uman, metoda Lowry (cu ori fără solubilizarea prealabilă a mitocondriilor cu detergenți) a dat rezultate concordante cu azotul proteic, pe cînd metoda Gornall a dat valori de 1,8—2,6 ori mai mari, datorită turbidității. Prin urmare metoda Lowry este adecvată dozării proteinelor din mitocondriile bogate în lipide, cum sînt și cele din ficatul uman.

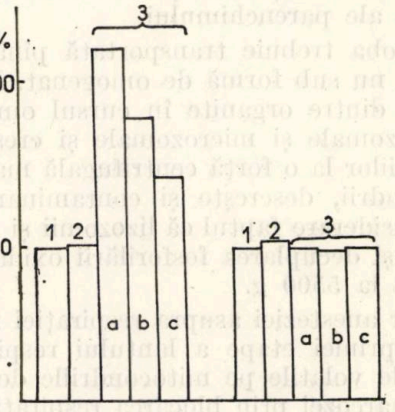


Fig. 3. — Determinarea proteinelor din mitocondriile izolate din ficatul de șobolan și uman prin trei metode:

1. Determinarea prin metoda Kjeldahl (18): 0,1 ml din suspensia mitocondrială s-au tratat cu acid tricloracetic 5%. După centrifugare supernatantul s-a îndepărtat, iar sedimentul s-a tratat cu 0,5 ml H_2SO_4 concentrat. După digestia proteinelor cu mici cantități de H_2O_2 s-a determinat amoniacul prin procedeul Parnas-Wagner. Proteinele determinate prin metoda Kjeldahl (N proteic. 6,25) au fost considerate 100% și diferențele reprezentate prin coloane sînt media a 4—7 experiențe; *2.* Determinarea prin metoda Lowry (17): Mitocondriile s-au diluat de 6—10 ori cu apă distilată. 15—30 µl din această suspensie s-au tratat cu 185—170 µl apă distilată și 5 ml reactiv Folin-Ciocâlteu. După 5 minute s-au adăugat 0,5 ml reactiv Lowry diluat 1 : 2 cu apă distilată și după 30 minute de dezvoltare a culorii s-au măsurat extincțiile la 660 nm; *3.* Determinarea prin metoda Gornall (16): 30—50 µl din suspensia mitocondrială s-au tratat cu dezoxicolat de Na 5% (50 µl), 0,4 ml NaOH 1 N și 2 ml reactiv Gornall (16). Probele s-au măsurat la 540 nm față de un martor care conținea toți reactivii în afară de mitocondrii, după 15 minute, cu (3 *b*) sau fără extracția lipidelor cu eter (3 *a*) după efectuarea reacției de culoare. În alte determinări (3 *c*) mitocondriile s-au tratat cu 5 ml etanol 95% la —5°C. După centrifugare la 3500 g și —5°C, sedimentul s-a resuspendat în 0,45 ml NaOH 1 N și s-a tratat ca mai sus.

DISCUȚII

În timp ce studiile anterioare pe mitocondriile din ficatul uman necesitau biopsii de 4—8 g țesut (3, 4) în cazul nostru din 0,5 g s-au putut izola mitocondrii în cantitate suficientă pentru diferite studii metabolice. Considerăm că prelevarea unei probe încă și mai mici prin biopsie chirurgicală nu este adecvată, fiindcă țesutul periferic subcapsular nu reflectă proprietățile funcționale ale parenchimului.

După recoltare proba trebuie transportată pînă în laborator sub formă de țesut întreg și nu sub formă de omogenat. Probabil că distrugerea relațiilor normale dintre organite în cursul omogenizării produce activarea enzimelor lizozomale și microzomale și crește activitatea lor. Sedimentarea mitocondriilor la o forță centrifugală mai joasă, deși scade randamentul în mitocondrii, descrește și contaminarea cu lizozomi și microzomi. Luînd în considerare faptul că lizozomii și microzomii produc umflarea mitocondriilor și decuplarea fosforilării oxidative (22, 23), este preferabilă sedimentarea la 5500 g.

Urmărirea efectelor anesteziei asupra respirației mitocondriilor este justificată de inhibiția primei etape a lanțului respirator, produsă de barbiturice și anestezicele volatile pe mitocondriile de șobolan (24). S-a căutat chiar explicația narcozei prin blocarea respirației celulare. Astăzi această teorie a narcozei nu mai poate fi susținută, totuși o inhibiție a respirației mitocondriilor în cursul anesteziei n-ar fi exclusă. În cazul nostru s-au observat diferențe mici între activitatea mitocondriilor la începutul și sfîrșitul operației la unii bolnavi hepatici. Aceste diferențe, deși apar doar cu unele substrate, ar putea fi datorite stressului operator sau anestezicelor folosite. Influența stressului operator a fost exclusă pe baza observației nr. 56 (tabela 2) în care durata operației a fost foarte mare, peste 3 ore, și în cursul căreia s-a produs o scădere marcată a tensiunii arteriale (sub 5), dovadă a unui șoc operator marcat. În aceste condiții nu s-a observat nici o inhibiție a respirației mitocondriilor sub influența operației. Deci, este probabil că inhibiția primei etape a lanțului respirator mitocondrial, observată la bolnavii hepatici, este datorită acțiunii anestezicelor. Efectele, în aparență mici, se pot explica ținînd cont că anestezicele se pot volatiliza în cursul separării mitocondriilor, iar ceea ce se observă este doar „amprenta" lor. Nu este întîmplător că inhibiția s-a constatat în cazul mitocondriilor izolate din ficatul patologic, în care conținutul de lipide al mitocondriilor este mai mare.

Acțiunea protectoare a albuminei serice degresate în cursul omogenizării și a spălărilor, ca și în mediul de incubare, este evidentă, ducînd la stimularea respirației și la obținerea unui control acceptor mai mare. Aceste rezultate sînt similare celor obținute pe mitocondriile izolate din mușchii larvelor și ai insectelor adulte (25,26), din țesutul adipos brun (27, 28) și din tumori (29). Comun tuturor acestor tipuri de mitocondrii este conținutul lor mare de lipide, sursă de acizi grași liberi (AGL). O parte din AGL rezultă din activarea fosfolipazelor și a lipazelor din diferite organite. Astfel, fosfolipaza A_2 mitocondrială (scindează fosfatidele la poziția C_2), fosfolipaza A_1 din microzomi (scindează fosfatidele la poziția

C_1), și fosfolipaza lizozomală (scindează acizii grași la pozițiile C_1 și C_2 în proporție egală) ca și trigliceridlipazele prezente în toate fracțiunile ficatului de șobolan, eliberează AGL, dar în același timp eliberează și lizofosfatide (30, 33). Apoi, prin acțiunea acestor enzime sînt lizate lipidele și fosfolipidele necesare pentru structura și funcția normală mitocondrială (34, 35). Albumina își exercită efectele prin fixarea AGL, care acționează ca decuplanți ai fosforilării oxidative (35—39), dar inhibă și acțiunea fosfolipazelor (40). Pe lîngă aceasta, albumina contracarează efectele lizozomilor și ale microzomilor asupra mitocondriilor. În cazul ficatului uman albumina este necesară și pentru fixarea bilirubinei, care de asemenea exercită efecte decuplante și de umflare asupra mitocondriilor (41, 42).

Consumul de oxigen cu diferite substrate a fost de ordinul de mărime al datelor din literatură (2—6). Diferențele se pot explica prin condițiile diferite de izolare și de incubare. Dealtfel, după cum reiese din datele noastre, condițiile de incubare au o importanță deosebită pentru stabilirea valorilor de referință ale activităților respiratorii pentru modificările patologice.

Valorile scăzute ale citocromoxidazei determinate spectrofotometric și un comportament special al mitocondriilor din ficatul uman la diferite tratamente indică unele proprietăți structurale și cinetice ale porțiunii terminale a lanțului respirator în mitocondriile din ficatul uman. Activitatea maximă a fost obținută prin tratarea mitocondriilor prin șoc osmotic și nu prin dezoxicolat de sodiu, cum au propus Smith și Camerino (13, 14), ca metodă standard.

Raportarea activităților enzimatice, trebuie să se facă la proteinele mitocondriale dozate prin metoda Lowry (17). Procedeul Gornall (16) nu este adecvat în cazul mitocondriilor bogate în lipide, din cauza turbidității. Procedeul Lowry este adecvat datorită sensibilității și pentru că dozează tirozina, care se află în cantitate mică în țesutul conjunctiv. Deci, putem estima „proteinele funcționale" din ficat, iar în cazul cantităților mici de țesuturi numai acest procedeu este aplicabil.

CONCLUZII

1. Izolarea mitocondriilor din ficatul uman ridică probleme speciale. Pentru obținerea unei fracțiuni pure și cu integritatea păstrată este recomandabilă centrifugarea la o turație relativ joasă; adausul albuminei serice degresate la mediul de izolare și de incubare este necesar pentru a proteja mitocondriile de acțiunea unor factori nocivi (bilirubină, acizi grași liberi, lizofosfatide).

2. Valorile consumului de oxigen sînt influențate de compoziția mediului de incubare. De aceasta trebuie să se țină cont la stabilirea valorilor „normale", ca referință pentru modificările patologice. Anestezicele volatile pot inhiba prima etapă a lanțului respirator la bolnavii hepatici.

3. Mitocondriile din ficatul uman prezintă particularităţi structurale şi funcţionale (compoziţia membranelor, activitatea diferitelor enzime), astfel că acest gen de studii prezintă interes atît din punctul de vedere al cercetării fundamentale, cît şi aplicative.

Prezentat la redacţie
la 6 noiembrie 1973

Disciplina de biochimie
I.M.F. Cluj

SUBCELLULAR FRACTIONATION OF HUMAN LIVER

I. ISOLATION OF THE MITOCHONDRIAL FRACTION

SUMMARY

A reproducible procedure for isolation of the mitochondrial fraction from small samples of human liver obtained by intraoperatory biopsy is described. The isolation of human liver mitochondria raises some special problems. The transport of the tissue from surgery to the laboratory has to be done in bulk and not as a homogenate. With some hepatobiliary patients an inhibition of the first part of the respiratory chain might appear due to the anesthetics. The addition of defatted serum albumin (1% final concentration) to the incubation and isolation media permitted a stimulation of respiration and a higher acceptor control. By sedimenting the mitochondria at a smaller centrifugal force the contamination with lysosomes and microsomes is lowered, although the yield of mitochondria also decreased. The factors that influence the values of oxygen uptake were studied in order to establish the reference values for the pathological alterations. Cytochrome oxidase activity of isolated human liver mitochondria was smaller than that of rat and rabbit liver mitochondria, indicating some peculiarities of the terminal part of the respiratory chain in human liver mitochondria. The refering of enzyme activities has to be done per mitochondrial protein determined by the Lowry's method, which is the most sensitive and reflects the "functional" protein of hepatic parenchyma.

BIBLIOGRAFIE

1. E. Schmidt, F.W. Schmidt, Enzymol. Biol. Clin., **11**, 67 (1970).
2. L. Pagliaro, A. Notarbartolo, V. Mannino, C. Migneco, J. Lab. Clin. Med., **62**, 185 (1963).
3. T. Schersten, S. Bjorkerud, L. Jakoi, P. Bjorntorp, Scand. J. Gastroenterol., **1**, 284 (1966).
4. P. Bjorntorp, S. Bjorkerud, T. Schersten, Biochim. Biophys. Acta, **111**, 375 (1965).
5. K. Ozawa, O. Kitamura, T. Mizukami, Y. Yamaoka, K. Takarazu, H. Takeda, H. Takasan, I. Honjo, Clin. Chim. Acta, **38**, 385 (1972).
6. G. Benga, L. Mureşan, A. Hodarnau, S. Dancea, Biochem. Med., **6**, 508 (1972).
7. G.H. Hogeboom, în „Methods in Enzymology", edit. S.P. Colowick, N.O. Kaplan, Acad. Press. New York, vol. 1, 16 (1955).
8. O. Bârzu, V. Borza., Anal. Biochem, **21**, 344 (1967).

9. O. BÂRZU, L. MUREȘAN, C. TARMURE, Anal. Biochem., **24**, 249 (1968).
10. O. BÂRZU, L. MUREȘAN, G. BENGA, Anal. Biochem., **46**, 374 (1972).
11. O BÂRZU, P. CIOARĂ, Anal. Biochem., **43**, 630 (1971).
12. E.C. SLATER., în *Methods in Enzymology*, edit. S.P. Colowick, N.O. Kaplan, Acad. Press, New York, vol. **X**, 48 (1967).
13. L. SMITH, W.P. CAMERINO, Biochemistry, **2**, 1428 (1963).
14. L. SMITH, W.P. CAMERINO, Biochemistry, **2**, 1432 (1963).
15. O.H. LOWRY, J.A. LOPEZ, J. Biol. Chem., **162**, 421 (1946).
16. A.G. GORNALL, C.L. BARDAWILL, M.M. DAVID, J. Biol. Chem., **177**, 751 (1949).
17. O.H. LOWRY, N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR, R.J. RANDALL, J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951).
18. I. MANTA, AL. CIPLEA, *Metodele laboratorului clinic*, Cartea Românească, Cluj, 1947.
19. G.R. MORRISON, I.E. KARL, R. SCHWARTZ, R.E. SHANK, J. Lab. Clin. Med., **65**, 248 (1965).
20. E. SCHMIDT, F.W. SCHMIDT, Enzymol. Biol. Clin. **2**, 201 (1962/63).
21. E. OLSON, P.J. VIGNOS, J. WOODLOCK, T. PERRY, J. Lab. Clin. Med., **71**, 220 (1968).
22. A. MELLORS, A.L. TAPPEL, P.L. SAWANT, I.D. DESAI, Biochim. Biophys. Acta, **143**, 299 (1967).
23. Y. AVI-DOR, Biochim. Biophys. Acta, **39**, 53 (1960).
24. R.N. MILLER, F.E. HUNTER, Mol. Pharmacol., **6**, 68 (1970).
25. B. SACKTOR, J.J. O'NEILL, D.G. COCHRAN, J. Biol. Chem., **233**, 1233 (1958).
26. L. WOJTCZAK, A.B. WOJTCZAK, Biochim. Biophys. Acta., **39**, 277 (1960).
27. R.J. GUILLORY, E. RACKER, Biochim. Biophys. Acta., **153**, 490 (1968).
28. F.J. GRAV, J.I. PEDERSEN, E.N. CHRISTIANSEN., Eur. J. Biochem., **12**, 11 (1970).
29. P. EMMELOT, Cancer Res., **22**, 38 (1962).
30. J. NACHBAUR, P.M. VIGNAIS, Biochem. Biophys. Res. Commun., **33**, 315 (1968).
31. P. BJORNSTAD, Biochim. Biophys. Acta., **116**, 500 (1966).
32. S. FOWLER, C. DE DUVE., J. Biol. Chem., **244**, 471 (1969).
33. M. WAITE, L.L.M. VAN DEENEN, Biochim. Biophys. Acta., **137**, 498 (1967).
34. D.E. GREEN, S. FLEISCHER., Biochim. Biophys., Acta., **70**, 554 (1963).
35. C.R. ROSSI, L. SARTORELLI, L. TATO, N. SILIPRANDI, Arch. Biochem. Biophys., **107**, 170 (1964).
36. A.L. LEHNINGER, L.F. REMMERT, J. Biol. Chem., **234**, 245 (1959).
37. B.C. PRESSMAN, H.A. LARDY, Biochim. Biophys. Acta, **21**, 458 (1966).
38. D.R. HELINSKI, C. COOPER, J. Biol. Chem., **235**, 3573 (1970).
39. S.E. LEWIS, K.S. FOWLER, Biochim. Biophys. Acta, **38**, 564 (1960).
40. P. QUINN, R.M.C. DAWSON, Biochem. J., **67**, 558 (1970).
41. R. ZETTERSTROM, L. ERNSTER, Nature (London), **178**, 1335 (1956).
42. M.G. MUSTAFA, M.L. COWGER, T.E. KING, J. Biol. Chem., **245**, 1084 (1970).

ST. CERC. BIOCHIM., 17, 2, 137–144 (1974)

INFLUENȚA RAPORTULUI EFECTOR-SUBSTRAT ASUPRA COMPORTAMENTULUI PIROFOSFAT FOSFOHIDROLAZEI DIN FICATUL DE ȘOBOLAN

I. F. DUMITRU, DANA IORDĂCHESCU, S. NICULESCU, GABRIELA FILIPESCU
și ELENA BĂLTEANU

Rezumat. — A fost studiată variația activității pirofosfat fosfohidrolazei anorganice din extractele proteice totale ale ficatului de șobolan cu concentrația de substrat și de Mg^{2+}.

Pentru a obține o activitate maximă este necesar un raport substrat : efector de 1 : 20.

Mg^{2+}, Co^{2+}, și Zn^{2+} activează enzima, Ca^{2+}, Cd^{2+}, Mn^{2+} și Hg^{2+} o inhibă. A fost prezentată influența diferitelor rapoarte Mg : Zn și Mg: Co asupra activității enzimatice. pH optim pentru activitatea enzimatică variază cu constituția chimică a activatorului utilizat.

Pirofosfat fosfohidrolaza anorganică (EC 3.6.1.1) este o enzimă a cărui comportament variază specific cu sursa biologică din care s-a izolat și cu natura chimică a ionului metalic activator. Enzima a fost purificată și caracterizată structural și funcțional din surse ca *E. coli* (1—3), drojdie de bere (4—6), eritrocite (7, 8); din alte materiale biologice fiind mai puțin studiată. Studiul pirofosfat fosfohidrolazei din ficatul de șobolan a fost legat mai mult de repartiția subcelulară a enzimei (9, 10) — rezultatele cercetărilor în acest sens fiind contradictorii — și de existența unei singure proteine multifuncționale cu activitate de glucozo 6-fosfatază, pirofosfatază anorganică și pirofosfat glucozo fosfotransferază (11, 12).

În această lucrare prezentăm rezultatele cercetării raportului substrat-efector, în diferite condiții experimentale, la pirofosfat fosfohidrolaza din extractele proteice totale ale ficatului de șobolan.

MATERIAL ȘI METODE

Experiențele au fost efectuate pe șobolani albi, femele cu o greutate de aproximativ 120 g, linia de animale a biobazei Institutului Dr. V. Babeș.

Extracția proteinelor totale s-a realizat prin omogenizarea a 1 g țesut hepatic cu 10 ml apă distilată, într-un Potter. Procesul a fost desăvîrșit prin staționarea omogenatului, la 4°C, timp de o oră, după care s-a procedat la o centrifugare timp de 15 minute la 10.000 t.p.m. Supernatantul reprezintă extractul proteic total. Natura chimică a mediului

de extracţie precum şi timpul necesar realizării unei solubilizări maxime a enzimei luate în studiu au fost stabilite experimental.

Activitatea pirofosfat fosfohidrolizei a fost pusă în evidenţă şi dozată cantitativ prin determinarea fosforului anorganic, eliberat în urma hidrolizei enzimatice conform metodei Fiske-Subbarow (13). Activitatea enzimatică a fost exprimată în nmoli P_a/1 ml/ min/37°C.

Concentraţia proteinelor a fost dozată prin metoda descrisă de Lowry şi colab. (14).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Prima etapă a studiului realizat o reprezintă variaţia vitezei reacţiei enzimatice cu concentraţia pirofosfatului din mediul de reacţie (fig. 1), în lipsa unui efector şi în prezenţa unor concentraţii constante şi crescînde de $MgCl_2$ (5, 10, 20 şi 50 μmoli). Se constată că în lipsa Mg^{2+}, se înregistrează o activitate enzimatică foarte scăzută, care creşte puţin dar semnificativ cu concentraţia substratului (1—10 μmoli). Mg^{2+} prezintă un

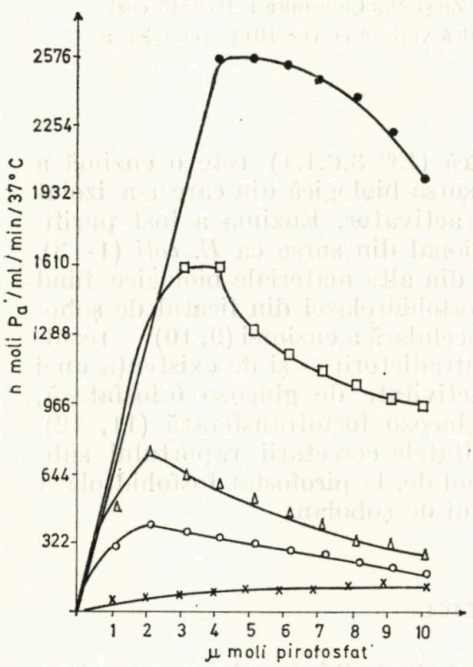


Fig. 1. — Variaţia activităţii pirofosfatazei anorganice din ficatul de şobolan cu concentraţia de pirofosfat. Mediul de reacţie conţine 0,98 mg proteină, pH componentelor fiind 7,4 (tampon Tris-HCl 1 × 10^{-2}M).

− × − × − fără efector; −O−O− cu 5 μmoli Mg^{2+}; −△−△− cu 10 μmoli Mg^{2+}; −□−□− cu 20 μmoli Mg^{2+}; −●−●− cu 50 μmoli Mg^{2+}

rol activator evident, în prezenţa lui se înregistrează inhibiţii la concentraţii mai mari în pirofosfat. Maximele curbelor care reprezintă variaţia vitezei reacţiei enzimatice cu concentraţia substratului depind de concentraţia efectorului, fiind deplasate spre concentraţii mai mari de pirofosfat pe măsură ce creşte cantitatea de $MgCl_2$ din mediul de reacţie. Aceste date experimentale au fost obţinute cînd mediul de reacţie prezenta

un pH de 7,4. Rezultatele noastre denotă că pentru realizarea unei activităţi enzimatice mari, la pH 7,4 este strict necesară prezenţa Mg^{2+}, care la concentraţii mai mari poate ridica efectul inhibitor al pirofosfatului, prin formarea de complecşi $MgP^2O_7^{2-}$, fapte relatate şi de alţi cercetători, în cazul enzimei izolate din surse bacteriene (2, 15).

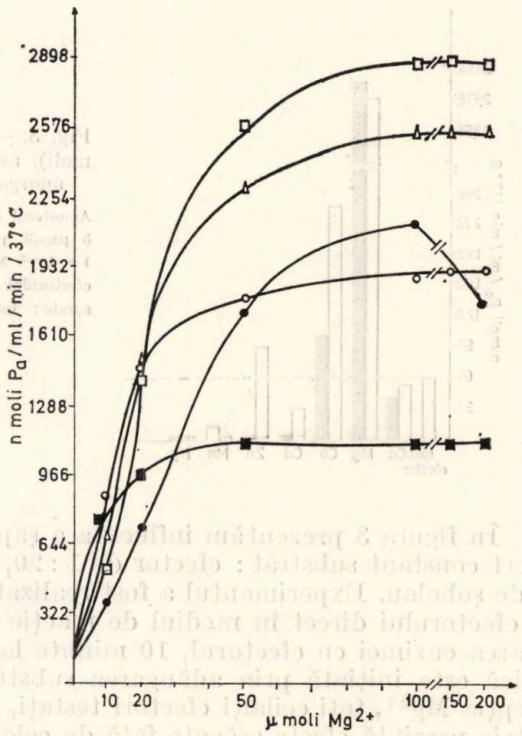


Fig. 2. — Variaţia activităţii pirofosfatazei anorganice din ficatul de şobolan cu concentraţia de Mg^{2+}, la cinci concentraţii de substrat.

-■-■- 2 µmoli; -○-○- 3 µmoli; -△-△- 4 µmoli; -□-□- 5 µmoli şi -●-●- 10 µmoli.

Variaţia vitezei reacţiei enzimatice, catalizate de pirofosfataza din ficatul de şobolan, cu concentraţia de Mg^{2+}, la concentraţii crescînde (2, 3, 4, 5 şi 10 µmoli) dar constante de substrat este prezentată în figura 2. Mediul de reacţie prezintă un pH de 7,4 iar concentraţia proteinelor este de 0,62 mg. La concentraţii de 2 şi 3 µmoli pirofosfat, curba variaţiei vitezei de reacţie cu concentraţia de Mg^{2+} prezintă alura unei hiperbole rectangulare, pentru ca la concentraţii mai mari (4,5 şi 10 µmoli substrat) funcţiile reprezentate grafic să prezinte în domeniul concentraţiilor mici de efector inflexiuni care se accentuează prin creşterea concentraţiei de pirofosfat. Acest comportament poate indica că magneziul îşi manifestă efectul total activator atît prin participarea lui la formarea adevăratului substrat al reacţiei enzimatice cît şi printr-un efect direct asupra enzimei însăşi. Inflexiunile, la concentraţii mari de substrat şi concentraţii mici de efector pot fi datorate şi inhibiţiei prin pirofosfat. O inhibiţie la concentraţii mari de Mg^{2+}, fapt remarcat de Josse (3) pentru enzima din *E. coli*, în cazul experimentului prezent, este înregistrată numai la concentraţia maximă de pirofosfat (10 µmoli). Datele fig. 2 indică pentru o

activitate enzimatică maximă o concentraţie de pirofosfat de 5 μmoli şi o concentraţie de Mg^{2+} de 100 μmoli, deci un raport optim substrat : efector de 1 : 20, mult mai mic decît cele găsite pentru enzima izolată din diferite surse vegetale (16, 17), dar identic cu cel găsit de Scheuch şi şi Rapoport (8) pentru pirofosfataza eritrocitară.

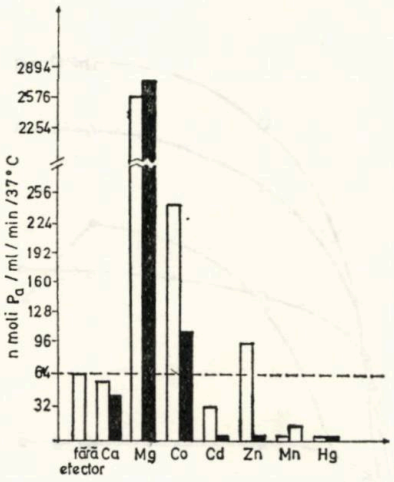


Fig. 3. — Influenţa unor efectori (100 μ moli) asupra activităţii pirofosfatazei anorganice din ficatul de şobolan.

Amestecul de reacţie conţine : 0,87 mg proteină şi 5 μmoli pirofosfat în soluţie tampon Tris-HCl 1×10^{-2} M, pH 7,4. Coloane haşurate : preincubarea efectorului cu preparatul enzimatic ; Coloane nehaşurate : introducerea efectorului direct în mediul de reacţie (v. text).

În figura 3 prezentăm influenţa a şapte efectori, la pH 7,4 şi la un raport constant substrat : efector de 1 : 20, asupra pirofosfatazei din ficatul de şobolan. Experimentul a fost realizat în două variante : introducerea efectorului direct în mediul de reacţie (coloane nehaşurate) şi preincubarea enzimei cu efectorul, 10 minute la 37°C, după care reacţia enzimatică este iniţiată prin adăugarea substratului (coloane haşurate). Cu excepţia Mg^{2+}, toţi ceilalţi efectori testaţi, prin preincubare cu extractul proteic prezintă efecte scăzute faţă de cele înregistrate în varianta experimentală de introducere directă a lor în mediul de reacţie. Nu am considerat semnificativă comportarea Mn^{2+}. Mg^{2+}, Co^{2+} şi Zn^{2+} prezintă efecte activatoare, dar influenţa ultimilor doi ioni reprezintă numai 9% şi respectiv 3,7% din efectul activator al Mg^{2+}, Prin preincubarea extractului cu ionul de zinc, efectul activator dispare fiind înlocuit de unul de inhibiţie totală a reacţiei enzimatice. Ca^{2+} şi Cd^{2+} prezintă efecte inhibitorii, în comparaţie cu reacţia enzimatică realizată în absenţa vreunui efector, iar Hg^{2+} şi Mn^{2+} sînt inhibitori totali. Indiferent de sursa din care a fost izolată pirofosfataza, toţi autorii care au studiat-o au găsit că cel mai puternic efect activator îl are ionul de Mg^{2+}. Pynes şi Yonnathan (18) demonstrează efectul activator al Mg^{2+}, Mn^{2+} şi Co^{2+} asupra enzimei eritrocitare, în timp ce Klemme şi colab. (19) demonstrează că o enzimă bacteriană este activată de Mg^{2+}, stabilizată de Co^{2+} şi necesită Zn^{2+} pentru menţinerea activităţii catalitice.

Faptul că prin preincubarea enzimei cu Mg^{2+} se accentuează efectul activator ne întăreşte convingerea că rolul acestui efector este mult mai complex decît simpla participare la formarea substratului.

Dat fiind că există studii (15, 20) care demonstrează necesitatea concomitentă a doi activatori, cu roluri funcţionale distincte, am tatonat şi influenţa diferitelor raporturi Mg : Zn (fig. 4) şi Mg : Co (fig. 5). Dacă Zn^{2+} şi Mg^{2+} — singuri, manifestă efecte activatoare asupra pirofosfatazei din ficatul de şobolan, în combinaţie (90 : 10 — 40 : 60 exprimate

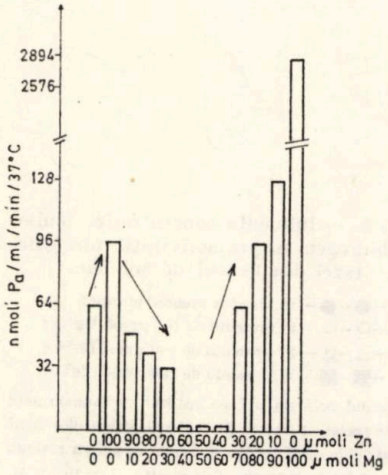


Fig. 4. — Influenţa diferitelor raporturi Mg : Zn asupra activităţii pirofosfatazei anorganice. Mediul de reacţie conţine 0,87 mg proteină, 5 µmoli substrat şi 100 moli efectori (Mg^{2+} + Zn^{2+}), în soluţie tampon Tris-HCl, 1×10^{-2} M, pH, 7,4.

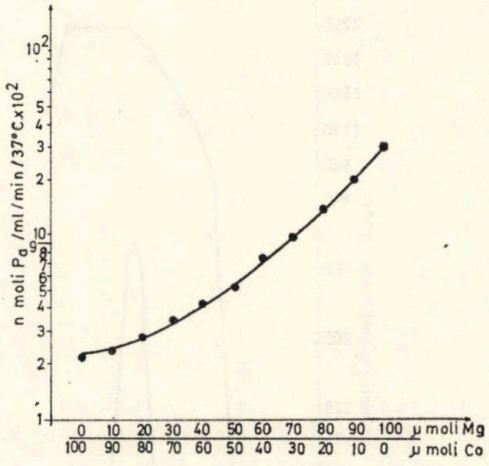


Fig. 5. — Influenţa diferitelor raporturi Mg : Co asupra activităţii pirofosfatazei anorganice (v. fig. 4).

în µmoli Zn : µmoli Mg) prezintă un efect inhibitor care se accentuează pînă la dispariţia activităţii enzimatice, pentru ca prin creşterea părţii de magneziu, efectul activator puternic al acestuia din urmă să domine. Creşterea vitezei reacţiei enzimatice prin Mg^{2+} sau Zn^{2+} şi inhibarea ei cînd în mediu coexistă cei doi efectori în anumite proporţii poate fi explicată printr-o afinitate mai mare a Zn^{2+} pentru anionul pirofosfat şi printr-o influenţă inhibitoare a zincului asupra enzimei însăşi, fapt demonstrat şi în fig. 3 în varianta experimentală de preincubare a enzimei cu acest efector, cînd se înregistrează o anulare a activităţii catalitice.

Influenţa diferitelor raporturi Co : Mg asupra vitezei reacţiei enzimatice demonstrează în mod clar cumularea celor două efecte activatoare.

Studiind variaţia vitezei reacţiei enzimatice cu concentraţia ionilor de hidrogen (fig. 6) atît în absenţa vreunui efector cît şi în prezenţă de Mg^{2+}, Co^{2+} şi Zn^{2+} se constată comportări deosebite. În absenţa vreunui efector, activitatea enzimatică prezintă două valori optime la pH 7,4 şi 9,15. Cînd în mediul de reacţie se introduc 100 µmoli Mg^{2+}, curba variaţiei vitezei de reacţie cu pH prezintă un domeniu de activitate optimă la (7,4—9,15). În prezenţa Co^{2+} pH optime sînt 4,45 şi 7,4 iar în prezenţa Zn^{2+} — 4,45 — 7,4 şi 9,15. Remarcabil este faptul că rolul activator al Mg^{2+} se manifestă în special în mediu alcalin, Co^{2+} activează enzima în

mediu acid şi neutru, în timp ce Zn^{2+} — deşi are efectul activator cel mai moderat — îşi manifestă acţiunea atît în mediul acid cît şi în mediul neutru şi alcalin. Deosebit de datele prezentate de Naganna şi colab. (20) care studiază comportamentul unei pirofosfataze anorganice vegetale la diferite concentraţii ale ionilor de hidrogen, noi găsim în absenţa vreu-

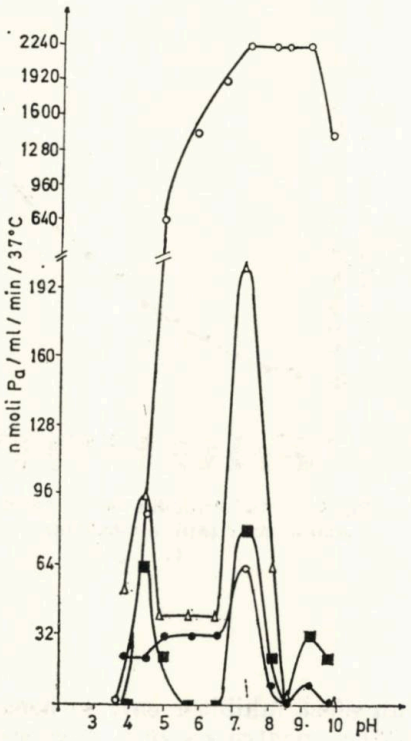


Fig. 6. — Influenţa concentraţiei ionilor de hidrogen asupra activităţii pirofosfatazei din ficatul de şobolan.

—●—●— în absenţa vreunui efector;
—○—○— în prezenţă de 100 μmoli Mg^{2+};
—△—△— în prezenţă de 100 μmoli Co^{2+};
—■—■— în prezenţă de 100 μmoli Zn^{2+}.

Domeniul acid de pH s-a realizat cu tampon acid acetic acetat, 1×10^{-2} M, anionul efectorului fiind acetat; domeniul neutru şi alcalin de pH s-a realizat cu o soluţie tampon Tris — HCl 1×10^{-2} M, anionul efectorului fiind Cl^-.

nui efector o activitate maximă la pH 7,4 — valoarea maximă de la pH 9,15 fiind sub cea a activităţii hidrolitice înregistrate în domeniul acid.

Rezultatele experienţelor cu diferiţi efectori demonstrează că pirofosfataza din ficatul de şobolan este o enzimă care este activată de ionii de Mg^{2+}, Co^{2+} şi Zn^{2+}, poate avea grupări SH esenţiale pentru activitatea catalitică fiind inhibată de Hg^{2+} şi Cd^{2+}, iar activatorii îşi fac prezentă acţiunea prin mecanisme diferite.

Acţiunea Mg^{2+}, Co^{2+} şi Zn^{2+} trebuie privită atît sub aspectul efectului lor direct asupra structurii tridimensionale a enzimei, cît şi asupra constituţiei chimice a substratului. Dacă prin preincubarea enzimei cu Mg^{2+} efectul activator sporeşte, efectuînd acelaşi gen de experiment cu Co^{2+} şi Zn^{2+} se înregistrează în primul caz o diminuare a efectului activator, iar în cel din urmă o inhibiţie totală. Cei trei ioni metalici pot intra şi în constituţia substratului, compoziţia chelatului variind cu concentraţia ionilor de hidrogen şi cu concentraţia efectorului. Situaţia se complică cînd în mediu coexistă Mg^{2+} şi Zn^{2+} pe de o parte şi Mg^{2+} şi Co^{2+} pe de altă parte, efectele finale fiind datorate competiţiei tuturor acestor fac-

tori. Pentru siguranţa interpretării este necesară purificarea enzimei şi un studiu chimic al stabilităţii şi solubilităţii diferiţilor chelaţi ai anionului pirofosfat cu Mg^{2+}, Co^{2+} şi Zn^{2+} — probleme care constituie subiectul viitoarelor noastre cercetări.

CONCLUZII

1. În extractele proteice totale obţinute din ficatul de şobolan, activitatea pirofosfatazei anorganice este maximă la un raport substrat : efector de 1 : 20.

2. Mg^{2+} şi Co^{2+} activează reacţia catalizată de pirofosfataza anorganică din ficatul de şobolan, Zn^{2+} are un efect activator fără o incubare prealabilă şi un efect inhibitor după incubarea cu enzimă.

3. Enzima prezintă mai multe pH optime de activitate a căror valori sînt funcţie de natura chimică a activatorului utilizat.

Universitatea Bucureşti, Facultatea de Biologie — Institutul de Ştiinţe Biologice, Departamentul de Biochimie şi Institutul de Genetică şi Patologie Medicală „Dr. V. Babeş" — Bucureşti —

THE INFLUENCE OF THE SUBSTRATE-EFFECTOR RATIO UPON THE BEHAVIOUR OF PYROPHOSPHATE PHOSPHOHYDROLASE OF RAT LIVER

SUMMARY

The variation of inorganic pyrophosphate phosphohydrolase activity was studied from total proteic extracts of rat liver with the substrate and Mg^{2+} concentration.

To obtain the maximum activity a substrate : effector ratio of 1 : 20 is necessary.

Mg^{2+}, Co^{2+} and Zn^{2+} activated the enzyme, Ca^{2+}, Cd^{2+}, Mn^{2+} and Hg^{2+} inhibited it. The influence of different ratios Mg : Zn and Mg : Co upon the enzymatic activity was presented. The optimum pH for the enzyme activity varied with the chemical constitution of the activator used.

BIBLIOGRAFIE

1. P. Burton, J. Josse, J. biol. Chem., **245**, 4358 (1970).
2. J. Josse, J. biol. Chem., **241**, 1938 (1966).
3. J. Josse, J. biol. Chem., **241**, 1948 (1966).
4. J. W. Ridlington, L. G. Butler, J. biol. Chem., **247**, 7303 (1972).
5. A. M. Owen, L. G. Butler, J. biol. Chem., **247**, 7308 (1972).
6. J. W. Ridlington, Y. Yang, L. G. Butler, Arch. Biochem. Biophys., **153**, 714 (1972).
7. L. M. Buruiană, E. Hadarag, Naturwiss., **52**, 620 (1965).

8. D. Scheuch, S. M. Rapoport, Acta biol. med. germ., **5**, 475 (1960).
9. C. R. Nordlie, H. Lardy, Biochim. Biophys. Acta, **50**, 189 (1961).
10. M. Irie, A. Yabuta, K. Kimura, Y. Shindo, K. Tomita, J. Biochem., **67**, 47 (1970).
11. R. C. Nordlie, W. J. Arion, J. biol. Chem., **239**, 1680 (1964).
12. R. E. Snoke, R. C. Nordlie, Biochim. Biophys. Acta, **139**, 190 (1967).
13. C. H. Fiske, Y. Subbarow, J. biol. Chem., **66**, 375 (1925).
14. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, L. A. Farr, R. J. Randall, J. biol. Chem., **193**, 265 (1951).
15. J. H. Klemme, H. Gest, Proc. Nat. Acad. Sci. US, **68**, 721 (1971).
16. J. W. Rip, W. E. Rauser, Phytochem., **10**, 2615 (1971).
17. C. Bucke, Phytochem., **9**, 1303 (1970).
18. G. D. Pynes, E. S. Yonnathan, J. biol. Chem., **242**, 2119 (1967).
19. J.H. Klemme, B. Klemme, H. Gest, J. Bacteriol., **108**, 1122 (1971).
20. B. Naganna, A. Raman, B. Venugopal, C. E. Sripathi, Biochem. J., **60**, 215 (1955).

ST. CERC. BIOCHIM., 17, 2, 145–148 (1974)

ADSORBȚIA PE HÎRTIE DE FILTRU A UNOR PROTEINE GLOBULARE DENATURATE

EUGENIA GOINA și MEDARD KEREKES

Rezumat. — S-a urmărit efectul denaturării prin căldură și uree asupra adsorbției pe hîrtie de filtru a ribonucleazei, serumalbuminei și gamma-globulinei. În urma denaturării prin căldură se constată o marcată scădere a suprafeței spoturilor obținute pe hîrtie, care se datorește fenomenului de agregare a moleculelor. Ureea 8 M provoacă numai o ușoară scădere a suprafeței spoturilor.

Studiindu-se comportarea proteinelor în cursul adsorbției lor pe hîrtie de filtru [1]—[6], s-a constatat că suprafața spotului format de proteina adsorbită este invers proporțională cu greutatea moleculară a proteinei [4], iar pentru aceeași proteină suprafața spotului este direct proporțională cu concentrația soluției proteice [2], [3].

Aceste constatări ne-au condus la ideea de a urmări procesul de denaturare a unor proteine globulare, prin adsorbția lor pe hîrtie de filtru.

MATERIAL ȘI METODE

S-a întrebuințat hîrtie de filtru Whatman 1, în benzi de 5/10 cm, și următoarele proteine: ribonuclează (Reanal, din pancreas bovin, de 4 × cristalizată, Gm= 15 000), serumalbumină (NBCo, bovină, cristalizată, Gm= 68 000) și gamma-globulină (Schuchardt, bovină, Gm= = 150 000), în soluții 1% și 0,05%. Soluțiile proteice s-au preparat în tampon fosfat 0,1 M, pH = 7,3, respectiv în tampon acetat 0,1 M, pH=3,8.

Denaturarea prin căldură s-a efectuat menținînd soluțiile de proteine timp de 5 minute la temperaturi cuprinse între 30—100°C. Denaturarea cu uree s-a efectuat numai pentru soluțiile de proteine 1%, în soluție de uree 8 M, timp de o oră. În acest caz, prin diluarea soluției de proteină la concentrația de 0,05% s-a realizat și diluarea ureei la 0,4 M, concentrație ce nu afectează adsorbția.

S-au aplicat pe hîrtia de filtru 40 μl din soluția de proteină 0,05%. Soluțiile 1 %, după denaturare, au fost diluate la concentrația 0,05%. După uscare la temperatura camerei și fixare cu etanol 96% timp de 5 minute, benzile au fost colorate cu albastru de bromfenol 1% în etanol 96%. Excesul de colorant s-a îndepărtat spălînd banda de hîrtie cu acid acetic 0,5%. Suprafața sporturilor s-a exprimat în mm^2.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Spoturile obţinute pe benzile de hîrtie Whatman 1 sînt bine conturate. Tabela 1 cuprinde datele obţinute pentru cele trei proteine studiate, în tampon fosfat, în urma denaturării prin căldură.

În figura 1 se redă variaţia suprafeţei spoturilor în funcţie de temperatură pentru albumina 1% şi 0,05%. Un aspect caracteristic al curbei

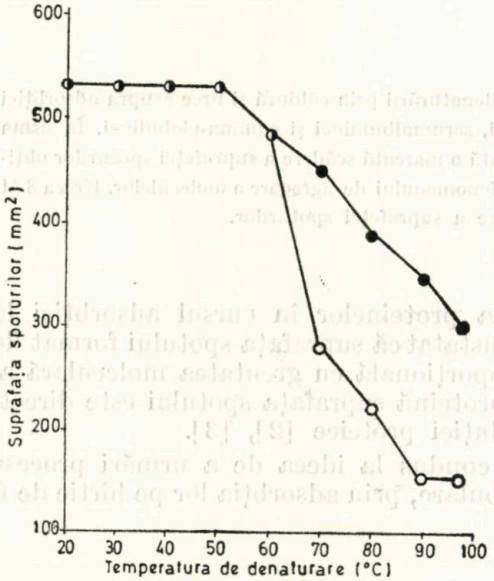


Fig. 1. — Variaţia suprafeţei spoturilor formate pe hîrtie de filtru pentru albumină în funcţie de temperatura denaturării.
—●— albumină 0,05 %; —○— albumină 1 %; —◑— valori comune.

este scăderea bruscă a suprafeţei spotului în cazul soluţiei 1%, în intervalul de temperatură 60—70°C.

Considerăm că scăderea suprafeţei spotului se datoreşte în primul rînd creşterii dimensiunilor particulelor în urma agregării moleculelor proteice. Soluţiile de ovalbumină denaturate prin căldură conţin agregate compuse din 5—20 molecule, în funcţie de condiţiile în care s-a făcut încălzirea [7]. Serumalbumina bovină formează şi ea agregate sub acţiunea căldurii, prin reacţia de schimb disulfid — tiol [8]. Bazîndu-ne pe observaţia că suprafaţa spotului este invers proporţională cu greutatea moleculară a proteinelor [4], am calculat că se formează trimeri în cazul albuminei 0,05% denaturate la 90°C, şi tetrameri cînd denaturarea s-a făcut la 97°C. În cazul soluţiei de albumină 1%, la 90°C se formează agregate compuse din 6 molecule.

Importanţa concentraţiei proteinei în procesele de denaturare este pusă în evidenţă de diferenţa dintre cele două curbe din figura 1. În cazul soluţiei mai concentrate agregarea se produce în salturi şi este mai pronunţată, în timp ce în soluţia mai diluată ea apare ca un proces continuu. Formarea de agregate mai mari paralel cu creşterea temperaturii are ca

urmare şi scăderea solubilităţii proteinelor. Astfel, gamma-globulina precipită deja la temperatura de 80°C, iar ribonucleaza la 97°C (tabela 1).

Trebuie de asemenea luat în considerare şi faptul că modificarea proprietăţilor de adsorbţie poate să fie influenţată şi de alţi factori, ca modificarea formei moleculelor sau a proprietăţilor lor electrochimice. În

Tabela 1

Influenţa temperaturii asupra dimensiunii spoturilor obţinute pe hîrtie de filtru în urma aplicării soluţiilor de proteine denaturate în tampon fosfat, 0,1 M pH, = 7,3.

Temperatura °C	Suprafaţa spoturilor în mm²			
	Albumină 1%	Albumină 0,05%	gamma-globulină 1%	Ribonuclează 1%
22	528	528	378	636
30	528	528	378	636
40	528	528	378	636
50	528	528	378	636
60	487	490	378	636
70	283	450	327	636
80	226	390	precipită	346
90	153	345	"	298
97	153	297	"	precipită

urma denaturării devin accesibile grupări ionizate ca COOH, NH_2 şi OH (tirozinic), parţial mascate în molecula nativă [9]. Modificarea stării electrice a moleculelor proteice determină printre altele schimbarea vitezei de migrare electroforetică [10]—[12], şi acţionează probabil şi asupra proprietăţilor de adsorbţie a proteinelor.

În cazul soluţiilor de proteină în tampon acetat s-au format spoturi de dimensiuni mai reduse, care practic nu şi-au modificat suprafaţa la diferite temperaturi. pH-ul acid fiind un factor protector faţă de denaturare, repartizarea sarcinilor electrice imprimă macromoleculei o conformaţie mai compactă şi astfel ea devine mai rezistentă. Pe lîngă aceasta, pe suprafaţa moleculei predominînd sarcinile pozitive, este stînjenită formarea agregatelor, ele respingîndu-se.

Ureea a provocat o uşoară scădere, de aproximativ 11%, a suprafeţei spotului în cazul albuminei.

În concluzie, adsorbţia proteinelor pe hîrtia de filtru poate fi folosită pentru urmărirea proceselor care au loc în cursul denaturării, în special a agregării.

Prezentat la redacţie la
11 decembrie 1973

Disciplina de biochimie medicală
Institutul de medicină şi farmacie
şi
Centrul de cercetări medicale
Tîrgu-Mureş

ADSORPTION BEHAVIOUR OF SOME DENATURED GLOBULAR PROTEINS ON FILTER PAPER

SUMMARY

The action of heat and urea denaturation on the adsorption behaviour on filter paper of ribonuclease, serumalbumin and gammaglobulin was investigated. Heat denaturation produces a significant decrease of the spot areas, due to the aggregation of protein molecules. 8 M urea causes only a slight decrease of the spot areas.

BIBLIOGRAFIE

1. K. Simon, Med. Monatsschr., **11**, 662 (1957).
2. A. Kovacs, M. Kerekes, M. Major, Revista medicală (Tg. Mureş) **5**, 447 (1959).
3. T. I. Pristoupil, Nature, **212**, 75 (1966).
4. M. Kerekes, A. Kovacs, Vth FEBS-Meeting, Prague, 1968, Abstracts p. 73.
5. T. I. Pristoupil, M. Kramlova, J. Chromatogr., **48**, 90 (1970).
6. T. I. Pristoupil, Chromatogr. Rev., **12**, 109 (1970).
7. C. F. C., McPherson, M. Heidelberger, J. Amer. Chem. Soc., **67**, 574 (1945).
8. H. A. McKenzie, M. D. Smith, R. G. Wake, Biochim. Biophys. Acta, **69**, 222 (1963).
9. M. Joly, *A physico-chemical approach to the denaturation of proteins*, 1965, Academic Press, London, and New York, p. 121.
10. S. Stokrová, P. Bartl, J. Sponar, Coll. Czech. chem. Commun., **25**, 1258 (1960).
11. A. Kovacs, M. Kerekes, Zschr. Inn. Med., **4**, 187 (1961).
12. M. Kerekes, St. cerc. biochim., **6**, 251 (1963).

ST. CERC. BIOCHIM., 17, 2, 149–155 (1974)

CERCETĂRI COMPARATIVE ASUPRA AMINOACIZILOR LIBERI LA DIFERITE SPECII DE FORMICIDE, SĂNĂTOASE ŞI ÎN FAZĂ DE TETANIE

ILEANA HURGHIŞIU şi DINU PARASCHIVESCU

Rezumat. — În cursul anului 1973 s-a cercetat conţinutul în aminoacizi liberi la speciile de formicide sănătoase (martor) şi anume : *Tetramorium caespitum* L., *Formica cunicularia* Latr., *Lasius niger* L., *Camponotus aethiops* Latr. şi *Formica pratensis* Retz.

În fază de tetanie s-au analizat aminoacizii liberi de la indivizii de *Formica pratensis* Retz. Materialul de formicide s-a colectat din păşunile infestate cu dicroceliozâ din regiunea Mija, I.L. Caragiale, iar martorii din aceeaşi zonă precum şi din localităţile Sinaia şi Bucureşti.

Evoluţia aminoacizilor liberi diferă de la o specie la alta în funcţie de locul şi perioada de colectare a probelor. Faza de tetanie se caracterizează printr-o evoluţie inversă a aminoacizilor liberi în comparaţie cu cei identificaţi la martori. În general se remarcă o inhibare a procesului de sinteză a aminoacizilor liberi.

Pînă în prezent există puţine cercetări asupra aspectelor biochimice ale gazdelor complementare ale trematodului *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi 1819, Looss 1899), care au un rol important în transmiterea dicroceliozei la ovine, boală de o deosebită importanţă teoretică şi practică. Cercetările s-au axat în special asupra trematodului *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi 1819, Looss 1899), fiind efectuate de Rezink şi Bacojak (citat după 1). Aceştia prezintă date asupra mucopolizaharidelor, triptofanului şi compoziţiei enzimatice a sistemului nervos. Fenomenul de ecloziune a miracidului în mediul intestinal al gazdei intermediare (gasteropodele) este favorizat de prezenţa unor enzime de ecloziune, de concentraţia ionilor de hidrogen. Ovinele infestate experimental cu acest trematod manifestă modificări ale proteinelor, în special ale globulinelor, şi scăderea concentraţiei în vitamine (1).

Cercetările efectuate pînă în prezent au urmărit modificarea conţinutului în aminoacizi liberi la Formicide, în diferite condiţii ecologice (2), precum şi modificări specifice semnalate la furnicile infestate (3). Menţionăm că furnicile infestate se găsesc într-o fază caracteristică de imobilizare, denumită „fază de tetanie", atunci cînd chiştii cu metacercari ai trematodului sînt localizaţi în ganglionii cerebroizi ai furnicilor lucrătoare (4)–(7).

Avînd în vedere cele arătate mai sus, ne-am propus să urmărim comparativ modificările care au loc la nivelul aminoacizilor liberi la formicidele sănătoase (martor) și la cele infestate (tetanie).

MATERIAL ȘI METODĂ

Speciile de formicide martor s-au colectat din unele biotopuri ale zonelor variate situate la diferite altitudini, și anume : Mija, I. L. Caragiale, Sinaia și București. Speciile de formicide sănătoase identificate în aceste zone au fost : *Tetramorium caespitum* L., *Formica cunicularia* Latr., *Lasius niger* L., *Camponotus aethiops* Latr., și *Formica pratensis* Retz. În fază de tetanie, probele s-au colectat numai de la specia *Formica pratensis* Retz., deoarece numai la această specie de formicide s-a identificat faza de tetanie în condițiile anului 1973.

Probele de formicide aduse în stare proaspătă de pe teren (colectate din cuiburi), s-au analizat în prealabil la binocular, pentru a stabili corect materialul respectiv, adică furnici sănătoase sau care conțin chiști cu metacercari. Din aceste probe verificate s-au extras ulterior aminoacizii liberi, din 0,5 g material (aproximativ 50 exemplare). Acesta s-a omogenizat cu apă distilată, s-au îndepărtat proteinele prin precipitare cu acetonă clorhidrică 1%, iar lipidele prin spălări cu eter etilic (8), (9). Reziduul obținut s-a reluat cu amoniac 0,5 N și s-a aplicat pe hîrtia cromatografică MN 263. Solventul utilizat a fost butanol-acid acetic-apă (4 :1 :5). Colorarea s-a făcut cu ninhidrină 0,2% în butanol.

Tabela

Aminoacizi liberi din

Aminoacizi	Aprilie							Iu-
	București			Mija				Mija
	Formica pratensis.	Lasius niger.	Formica cunicularia	Formica pratensis	Camponotus aethiops	Lasius niger	Formica cunicularia.	Camponotus aethiops.	Formica pratensis
Cistină	—	—	—	+	—	—	—	—	—
Cisteină	+	—	+	+	—	—	+	—	—
Lizină	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Histidină	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginină	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acid aspartic	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Serină	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicocol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acid glutamic	+	+	+	+	+	+	+	—	+
Treonină	+	+	+	+	+	+	+	—	+
Alanină	+	—	+	+	+	—	+	—	—
Prolină	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Tirozină	+	—	+	+	+	+	+	—	+
Metionină	+	—	+	+	+	+	+	—	—
Valină	+	—	+	+	—	+	—	—	—
Fenilalanină	+	—	—	+	—	—	—	—	—
Leucină	—	—	—	—	—	+	+	—	—
Total:	14	8	13	15	11	12	13	6	9

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Rezultatele obţinute sînt prezentate în tabelele 1 şi 2 şi în figura 1.

a) Modificarea conţinutului în aminoacizi liberi la diferite specii de formicide (martor)

S-au efectuat cercetări comparative asupra speciilor de formicide menţionate, în lunile aprilie, iulie şi septembrie 1973. În tabela 1, figura 1 se arată că există diferenţe semnificative la diferite specii de formicide, colectate din zone variate. Astfel:

La specia *Formica pratensis* Retz., numărul aminoacizilor şi componenţa lor variază de la o lună la alta. Variaţii evidente apar însă de la o zonă la alta chiar în cadrul aceleiaşi luni. La Sinaia există variaţii în conţinutul aminoacizilor liberi cuprinse între 9—15 aminoacizi, de la un punct de colectare la altul al aceleiaşi zone, respectiv de la un cuib la altul, iar în septembrie numărul aminoacizilor la *Formica pratensis* Retz., este crescut la 17 la indivizii colectaţi din localitatea Mija. Se constată o reducere evidentă a numărului de aminoacizi, precum şi variaţii în conţinutul acestora, din aprilie pînă la mijlocul lunii iulie, pentru ca din septembrie numărul acestora să crească din nou. La Bucureşti, la această specie s-a găsit în aprilie un număr mai mare de aminoacizi decît în luna septembrie.

1

Formicidae (martor) 1973

lie				Septembrie								
Sinaia				Bucureşti				Mija				Sinaia
Formica pratensis												
Carieră	Biotop I.	Carieră veche	Scorbură	Formica pratensis	Tetramorium caespitum	Formica cunicularia	Lasius niger.	Formica pratensis	Lasius niger.	Tetramorium caespitum	Formica cunicularia	Formica pratensis carieră veche
—	—	—	—	+	—	—	—	+	—	+	+	+
+	—	—	+	+	—	+	—	+	—	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	—	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+
+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
+	—	+	+	—	—	+	—	+	—	—	+	+
—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	+
+	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+
+	—	+	+	+	—	—	—	+	—	—	+	+
+	—	+	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+
+	—	—	+	—	—	—	—	+	+	+	+	+
—	—	—	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+
14	6	12	15	12	8	11	9	16	8	11	14	17

La specia *Lasius niger* L. se găsesc modificări exprimate printr-un număr scăzut de aminoacizi în comparație cu cel identificat la *Formica pratensis* Retz. Apar unele variații evidente în aceeași lună, de la o localitate la alta, cu unele deosebiri între București și Mija.

La *Formica cunicularia* Latr. numărul aminoacizilor identificați a fost mai mare decît la speciile *Lasius niger* L. și *Camponotus aethiops* Latr. și nu a prezentat oscilații evidente de la o localitate la alta. În cadrul aceleiași localități apar însă modificări ale aminoacizilor liberi de la o perioadă la alta.

Tetramorium caespitum L. prezintă un număr redus de aminoacizi la probele colectate din localitatea Sinaia, în comparație cu cei identificați la această specie în București. Numărul acestora variază între cei găsiți la *Lasius niger* L., și *Formica cunicularia* Latr. În general putem spune că numărul aminoacizilor la speciile de formicide martor investigate este mai crescut la indivizii colectați din localitățile Mija și Sinaia, în comparație cu București, unde s-a găsit în general o scădere evidentă a acestora.

Datele prezentate arată că modificările conținutului aminoacizilor liberi la formicide trebuie considerate, în totalitatea lor, în sensul modificărilor de la specie la specie, în cazul aceleiași specii de la o perioadă la alta de colectare, de la o localitate la alta, de la o zonă la alta și chiar la date diferite de colectare în cadrul aceleiași luni.

b) Modificarea conținutului în aminoacizi liberi la specia Formica pratensis Retz. (în fază de tetanie)

Din tabela 2 și figura 1 se constată că numărul aminoacizilor liberi la *Formica pratensis* Retz., în fază de tetanie, înregistrează un maximum la probele colectate la data de 13 iulie 1973, pentru ca la sfîrșitul lunii iulie și, respectiv, în august acesta să fie evident scăzut. Evoluția aminoacizilor este inversă la martor în comparație cu cea găsită la *Formica pratensis* Retz. în stare de tetanie. În timp ce la martor numărul maxim s-a găsit primăvara și toamna, fiind cuprins între 15—16 aminoacizi, la speciile găsite în fază de tetanie numărul maxim este la mijlocul lunii iulie, și anume 12 aminoacizi. În general faza de tetanie se caracterizează prin modificări ale aminoacizilor liberi, care constau într-o inhibare a procesului de sinteză a acestora.

Modificări evidente s-au constatat la următorii aminoacizi : cistină-cisteină, alanină, tirozină, valină, fenilalanină și leucină.

Rezultatele obținute pînă în prezent reprezintă un început care ne dă indicații asupra faptului că în ciclul biologic al trematodului formicidele joacă un rol esențial și că la nivelul acestora apar dereglări evidente ale aminoacizilor liberi cu rol fundamental în sinteza proteinelor. Fiecărei specii de formicide îi sînt caracteristici anumiți aminoacizi din grupa aminoacizilor esențiali, respectiv prezența unor proteine specifice care caracterizează starea fiziologică normală sau cea patologică — de tetanie.

Tabela 2

Aminoacizi liberi din Formicidae, în fază de tetanie, 1973

Aminoacizi	mai	iulie				august
	14 mai	6 iulie	13 iulie	18 iulie	27 iulie	18 august
Cistină	—	+	+	—	—	—
Cisteină	—	+	+	—	—	—
Lizină	+	+	+	+	+	+
Histidină	+	+	+	+	+	+
Arginină	+	+	+	+	+	+
Acid aspartic	+	+	+	+	+	+
Serină	+	+	+	+	+	+
Glicocol	+	+	+	+	+	+
Acid glutamic	+	+	+	+	+	+
Treonină	+	+	+	+	+	+
Alanină	+	—	+	+	—	—
Prolină	—	—	—	—	—	—
Tirozină	+	—	—	—	—	—
Metionină	—	—	—	—	—	—
Valină	—	+	—	+	—	—
Fenilalanină	—	—	+	+	+	+
Leucină	+	—	—	—	—	—
Total	11	11	12	11	9	9

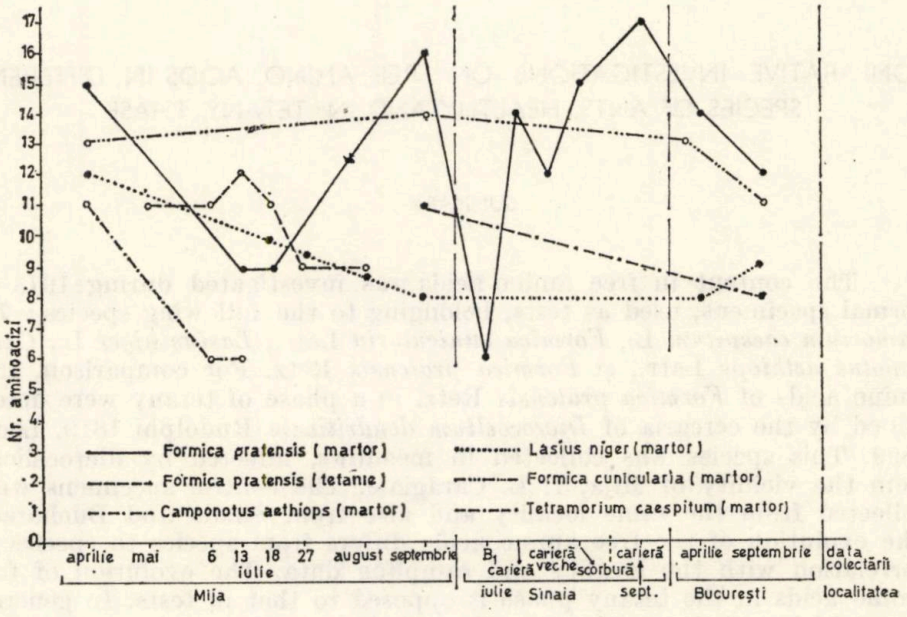


Fig. 1. — Variaţia conţinutului în aminoacizi liberi la specii de formicide martor şi în fază de tetanie colectate din diferite zone.

CONCLUZII

1. Conţinutul aminoacizilor liberi la diferite specii de formicide sănătoase variază de la specie la specie, de la o perioadă de colectare la alta, în diferitele biotopuri ale aceleiaşi localităţi.

2. La *Formica pratensis* Retz. (sănătoase) s-au constatat modificări ale aminoacizilor liberi la o gamă mai variată în comparaţie cu cei identificaţi în faza de tetanie şi anume apar în plus modificări la prolină şi metionină.

3. Dintre speciile de formicide cercetate, *Formica pratensis* Retz. conţine numărul cel mai mare de aminoacizi liberi, iar *Tetramorium caespitum* L., un număr evident redus.

4. Faza de tetanie la specia *Formica pratensis* Retz., se caracterizează prin dereglări profunde în conţinutul şi în numărul aminoacizilor liberi, exprimate în general printr-o inhibare a sintezei acestora.

Aceasta este evidentă în perioada iulie-august.

Prezentat la redacţie la 28 ianuarie 1974

Institutul de Ştiinţe Biologice
Laboratorul de Ecosisteme
Bucureşti

COMPARATIVE INVESTIGATIONS ON FREE AMINO ACIDS IN DIFFERENT SPECIES OF ANTS, HEALTHY AND IN TETANY PHASE

SUMMARY

The content in free amino acids was investigated during 1973 in normal specimens, used as tests, belonging to the following species : *Tetramorium caespitum* L., *Formica cunicularia* Latr., *Lasius niger* L., *Camponotus aethiops* Latr., şi *Formica pratensis* Retz. For comparison, free amino acids of *Formica pratensis* Retz. in a phase of tetany were determined by the cercaria of *Dicrocoelium dendriticum* Rudolphi 1819, Looss 1899. This species was collected in meadows, infected by dicroceliosis from the vicinity of Mija, I. L. Caragiale. The control specimens were collected from the same locality and also from Sinaia and Bucharest. The evolution of the free amino acids differs from species to species in correlation with the locality and sampling data. The evolution of free amino acids in the tetany phase is opposed to that in tests. In general, an inhibition of the synthesis process of the ants free amino acids takes place.

BIBLIOGRAFIE

1. V. Fromunda, *Dicrocelioza la ovine-studiu monografic și experimental*, Teză de doctorat, București, 1972.
2. D. Paraschivescu, I. Hurghișiu, St. cerc. biochim., **16**, 181 (1973).
3. D. Paraschivescu, I. Hurghișiu, Archiva veterinaria (sub tipar).
4. V. Fromunda, D. Paraschivescu, S. Popescu, Lucrările I.C.V.B. Pasteur, **4**, 269 (1965).
5. V. Fromunda, D. Paraschivescu, S. Popescu, V. Lungu, Lucrările I.C.V.B. Pasteur, **6**, 305 (1967).
6. V. Fromunda, S. Popescu, D. Paraschivescu, Archiva veterinaria, **1**, 85 (1973).
7. V. Hohorst, Z. f. Parasitenkunde, **22**, 105 (1962).
8. I. M. Haïs, K. Macek, *Cromatografia pe hîrtie*. Editura tehnică, București, 1960, p. 409.
9. I. Tanase, *Tehnica cromatografică*, Editura tehnică, București, 1967, p. 10.

ST. CERC. BIOCHIM., 17, 2, 157–163 (1974)

ASUPRA DEGRADĂRII ANAEROBE A AMIDONULUI ŞI CELULOZEI

MIRCEA IONESCU

Rezumat. — Fermentaţia acetopropionică a amidonului, al cărei mecanism chimic nu este lămurit, este precedată de trei procese fermentative mai simple — lactic, aceto-alcoolic şi aceto-hidrogenic — care se asociază şi conjugă. Degradarea anaerobă a celulozei, considerată ca o asociere a două procese fermentative distincte, paralele, unul metanic şi altul hidrogenic, reprezintă în realitate un proces de fermentaţie butirică şi unul de fermentaţie aceto-alcoolică, al cărui hidrogen rezultat în fermentaţie reduce ulterior bioxidul de carbon, dînd naştere metanului; formarea metanului este deci subordonată, nu paralelă, formării prealabile a hidrogenului.
Fermentaţia acetopropionică a amidonului şi aceea acetobutirică a celulozei sînt legate între ele formînd o unitate, caracteristică tuturor proceselor respiratorii.

În natură microorganismele sînt răspîndite peste tot. Numai în sol — unde se află o cantitate mare de materie organică moartă — microorganismele găsesc însă condiţiile cele mai bune unei activităţi extraordinare.

Sub acţiunea transformatoare a microorganismelor, materia organică a solului devine sediul desfăşurării a numeroase procese biochimice (1), (2), (3).

Sub acţiunea anumitor bacterii ca diferitele specii de *Clostridium*, şi în anumite condiţii, amidonul de exemplu (şi deci hexozele) suferă un proces de degradare fermentativă, dînd naştere la acid propionic, acid acetic şi CO_2.

Tot astfel, sub acţiunea unor bacterii celulozolitice, celuloza suferă un proces de degradare anaerobă, care duce la formarea unui amestec de acid butiric, acid acetic, alcool etilic, CO_2, hidrogen şi metan (1), (2).

Omelianschi a arătat că această degradare este datorită la două procese fermentative, adeseori asociate şi anume la un proces caracterizat prin producerea unor mari cantităţi de metan (fermentaţia metanică) şi la un proces caracterizat prin producerea unor cantităţi mult mai mici de hidrogen (fermentaţia hidrogenică); Omelianschi arată că aceste degradări fermentative sînt datorite activităţii a două bacterii şi anume bacteriei Bacillus metanicus care provoacă fermentaţia metanică (care joacă rol important în fermentaţia bălegarului) şi Bacillus fossicularum, care provoacă fermentaţia hidrogenică (1), (4).

Pe baza acestor cercetări s-a ajuns la concluzia, că fermentaţia anaerobă a celulozei — care are loc în natură pe scară largă atît în

sol cît şi în apă — este datorită la două procese fermentative asociate, paralele, unul hidrogenic şi altul metanic, procese care au fost formulate de Fedorov prin următoarele ecuaţii chimice (2) :

Fermentaţia:

$(C_6H_{10}O_5)_n + nH_2O \rightarrow CH_3.CH_2.CH_2.COOH + CH_3.COOH + CO_2 + H_2$ hidrogenică

$(C_6H_{10}O_5)_n + nH_2O \rightarrow CH_3.CH_2.CH_2.COOH + CH_3.COOH + CO_2 + CH_4$ metanică

Modul de interpretare a procesului fermentativ, ca şi ecuaţiile chimice, care vor să exprime natura acestui proces sînt însă în contradicţie cu faptele. În adevăr, principalul produs al fermentaţiei anaerobe a celulozei este acidul butiric şi acidul acetic, după cum rezultă din datele experimentale de mai jos ale lui Omelianschi (1), (4), unde aceste substanţe se formează într-o proporţie de 10—200 de ori mai mare ca aceea a metanului, respective a hidrogenului.

Produsele de degradare fermentative a celulozei, după Omelianschi

1. *În cazul acţiunii bacilului Metanicus* :

Acid acetic şi butiric	1,0223
Metan	0,1372
CO_2	0,672

2. *În cazul acţiunii bacteriei hidrogenice* :

Acid acetic şi butiric	2.2402
Hidrogen	0,0138
CO_2	0,9722

În degradarea fermentativă a celulozei ia naştere şi alcoolul etilic, care nu este exprimat în ecuaţiile chimice de mai sus date de Fedorov.

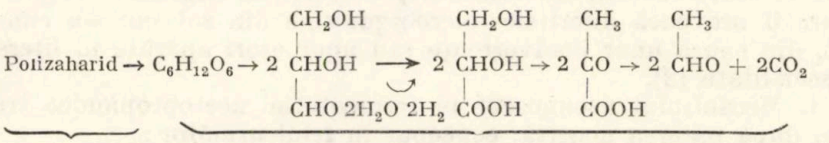
Ecuaţiile chimice de mai sus, nu reflectă legea conservării materiei, fiind greşit formulate.

Pentru toate aceste motive socotim că degradarea anaerobă a celulozei nu reprezintă o fermentaţie metanică şi una hidrogenică, ci una mai complexă, unde formarea metanului constituie un proces secundar.

Pentru a cunoaşte natura şi mecanismul proceselor de degradare fermentativă a amidonului şi a celulozei, este necesar să se ţină seama că ele sînt în realitate procese respiratorii şi că în consecinţă ele trebuie să fie asemănătoare, în oarecare măsură, tuturor proceselor respiratorii pe care le au şi celelalte organisme, —plante, animale şi alte microorganisme — care folosesc în acest scop aceleaşi materii hidrocarbonate, ale căror unităţi de bază se reduc în ultima analiză la o aceeaşi substanţă : zaharul hexozic sau un derivat al lui.

De aceea procesele de degradare respiratorie a tuturor organismelor vii, — diferite între ele mai ales din cauza condiţiunilor în care sînt obligate să trăiască — trebuie să fie legate între ele şi să manifeste o unitate. De aceea materia organică hidrocarbonată, oricare ar fi natura ei, pentru a suferi un proces de degradare respiratorie, trebuie în prealabil convertită prin hidroliză la formele ei mai simple, la unităţile ei de bază ; în acest fel, diferitele substanţe organice, cum sînt polizaharidele unitar,

mixte, ca şi cele formate din monozaharide şi derivaţii lor, — amidonul, celuloza, inulina, mananii, galactanii, hemicelulozele, materiile pectice, gumele şi mucilagiile vegetale şi altele — dau naştere, în cele mai multe cazuri, unei aceleeaşi substanţe, care de obicei este un zahar simplu; şi în acest fel începe unitatea procesului fermentativ. Zaharul rezultat din hidroliză, — independent de originea lui — se degradează apoi în acelaşi fel pînă la acid piruvic, respectiv pînă la aldehida acetică, străbătînd o serie de etape intermediare, marcate de formarea aldehidei glicerice şi a acidului gliceric; această fază formează „faza de inducţie" sau faza iniţială de degradare a moleculei de zahăr; ea e comună tuturor proceselor de degradare respiratorie provocate de diferitele organisme superioare sau inferioare, vegetale sau animale.



Faza hidrolitică — Faza iniţială „de inducţie" de degradare a moleculei de zahar (faza de glicoliză anaerobă)

În total:

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2\,CH_3.CO.COOH + 2\,H_2 \rightarrow 2\,CH_3.CHO + 2\,CO_3 + 2\,H_2$$

Numai după această fază de inducţie procesul fermentativ devine specific, diferenţiindu-se, după natura microorganismului care activează, după natura substratului care se degradează şi după condiţiile în care se dezvoltă procesul fermentativ.

În lumina acestor consideraţii degradarea amidonului şi a celulozei trebuie considerată în felul următor:

Amidonul şi celuloza fermentează în sol în mod diferit, sub acţiunea unor microorganisme diferite (speciile Clostridium în cazul amidonului şi bacteriile celulozolitice în cazul celulozei); aceste bacterii diferite dau naştere la fermentaţii diferite şi anume la o fermentaţie aceto-propionică în cazul amidonului, la o fermentaţie — numită impropriu — hidrogenică şi metanică în cazul celulozei (2).

Aceste două fermentaţii diferite au mai întîi un caracter unitar şi apoi unul specific şi deci diferit. În adevăr, amidonul şi celuloza, care sînt substanţe diferite, se hidrolizează mai întîi, dînd naştere unei aceleiaşi molecule de zahar, glucoza; aceasta se degradează apoi mai departe pînă la acidul piruvic, respectiv aldehida acetică. Numai după această fază de inducţie, care e aceeaşi în ambele fermentaţii, apar diferenţe, datorite sistemului enzimatic diferit al bacteriilor, care activează asupra produselor formate în faza de inducţie.

Unitatea şi diversitatea diferitelor procese respiratorii a microorganismelor este determinată deci de sistemul enzimatic de care dispune fiecare microorganism. În cazul sistemului enzimatic al microorganismelor amilolitice, sînt prezente aceleaşi enzime de degradare, de decarboxilare şi de oxido-reducere pe care le au şi bacteriile celulozolitice văzute.

Lipsesc însă din sistemul enzimatic al microorganismelor amilolitice, enzimele sintetizante, de condensare aldolică, care sînt prezente în cazul bacteriilor celulozolitice, şi care determină fermentaţia butirică a celulozei; sînt prezente, în schimb, enzime de reducere ale acidului piruvic la acidul lactic şi la acidul propionic, care lipsesc din sistemul enzimatic al bacteriilor celulozolitice.

Procesele de degradare respiratorie au deci unitate. Diferenţele, care imprimă caracterul specific al diferitelor fermentaţiuni, sînt datorite atît sistemului diferit enzimatic al fiecărui organism, cît şi naturii substratului şi condiţiunilor de mediu în care organismul este obligat să trăiască.

Aceste fapte nu au putut fi arătate pînă acum, deoarece nu s-a cunoscut în toate cazurile mecanismul proceselor de degradare respiratorie pe care îl provoacă diferitele microorganisme din sol sau s-a cunoscut greşit, din cauza unor inadvertenţe sau unor erori apărute în literatura de specialitate (2).

I. Mecanismul necunoscut al fermentaţiei acetopropionice trebuie să fie, după părerea noastră, conceput în felul următor:

Fermentaţia aceto-propionică reprezintă o asociere şi o conjugare de trei procese fermentative şi anume o fermentaţie lactică, una aceto-alcoolică şi una aceto-hidrogenică:

$$a.\ C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 \left[\begin{matrix} CH_3 \\ | \\ CO + 2\,H_2 \\ | \\ COOH \end{matrix}\right] \rightarrow 2 \begin{matrix} CH_3 \\ | \\ CHOH \\ | \\ COOH \end{matrix} \qquad \text{(lactică)}$$

$$b.\ C_6H_{12}O_6 + H_2O \rightarrow CH_3.COOH + CH_3.CH_2OH + 2\,CO_2 + 2\,H_2 \qquad \text{(aceto-alcoolică)}$$

$$c.\ C_6H_{12}O_6 + 2\,H_2O \rightarrow 2\,CH_3.COOH + 2\,CO_2 + 4\,H_2 \qquad \text{(aceto-hidrogenică)}$$

Fermentaţia aceto-alcoolică (*b*) şi aceto-hidrogenică (*c*) sînt rezultatul unui proces oxido-reducător al aldehidei acetice, apărute în degradarea inductivă a unei molecule de zahar; pe contul hidrogenului — format în degradarea inductivă şi în fermentaţia aceto-hidrogenică, — se reduce ulterior la acid lactic şi propionic, acidul piruvic apărut în degradarea inductivă a altei molecule de zahar, care devine astfel acceptor de hidrogen.

În acest fel, ultimele două reacţiuni generatoare de hidrogen — *b* şi *c* — se asociază şi se conjugă astfel cu fermentaţia lactică (*a*), în raportul $a + b$ şi $2\,a + b$, determinînd fermentaţia complexă aceto-propionică, care se exprimă deci prin două ecuaţii chimice parţiale, în felul următor:

$$2\,C_6H_{12}O_6 + H_2O \rightarrow 2\,CH_3.CH_2.COOH + 2\,H_2O + CH_3.COOH + CH_3.CH_2OH + 2\,CO_2$$

$$3\,C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \rightarrow 4CH_3.CH_2.COOH + 4H_2O + 2\,CH_3.COOH + 2\,CO_2$$

Prin însumare, aceste două ecuaţii chimice parţiale dau ecuaţia chimică generală a fermentaţiei aceto-propionice.

Acest proces de fermentaţie aceto-propionică a amidonului, — al cărui mecanism chimic nu a fost cunoscut pînă acum, arată şi caracterul

specific, dar totodată şi unitar al proceselor de degradare respiratorie al diferitelor microorganisme.

II. De asemenea, nu este lămurit pînă acum exact nici mecanismul degradării fermentative a celulozei sub acţiunea bacteriilor celulozolitice, după cum am arătat mai sus.

Pe baza consideraţiunilor noastre, procesul degradării anaerobe a celulozei trebuie să rezulte din asocierea fermentaţiei butirice şi aceto-alcoolice, care sînt premergătoare formării metanului. Acest proces trebuie deci să decurgă în felul următor :

Prima fază a acestui proces are loc după un acelaşi mecanism chimic comun de degradare inductivă a zaharului la aldehidă acetică, CO_2 şi H_2. Ulterior procesul fermentativ devine specific — anume butiric şi aceto-alcoolic, — prin condensarea aldolică a aldehidei acetice şi prin oxido-reducerea ei :

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2\,CH_3.CHO + 2\,CO_2 + H_2 \qquad \text{inductivă}$$

$$2\,CH_3.CHO \rightarrow CH_3.CH_2.CH_2.COOH \qquad \text{butirică}$$

$$2\,CH_3.CHO + H_2O \rightarrow CH_3.COOH + CH_3.CH_2OH \qquad \text{aceto-alcoolică}$$

Ansamblul produselor de degradare inductivă a moleculei de zahar şi a celor două fermentaţiuni fundamentale, care sînt asociate, se exprimă astfel :

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2\,CH_2O + 2\,CO_2 + 2\,H_2 \qquad \text{inductivă}$$

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3.CH_2.CH_2.COOH + 2\,CO_2 + 2\,H_2 \qquad \text{butirică}$$

$$C_6H_{12}O_6 + H_2O \rightarrow CH_3.COOH + CH_3.CH_2.OH + 2CO_2 + 2H_2 \qquad \text{aceto-alcoolică}$$

Într-o ultimă fază, acest proces devine apoi şi reducător, convertind bioxidul de carbon la metan, cu ajutorul hidrogenului dezvoltat anterior în faza de inducţie sau din cea următoare de oxido-reducere, conform ecuaţiilor :

$$CH_3.COOH \rightarrow CH_4 + CO_2 \qquad \text{decarboxilare}$$

$$CO_2 + 4\,H_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O \qquad \text{reducere}$$

$$\begin{array}{lcl} CO_2 & H_2 & CH_4 + 2\,H_2O \\ & +\,4 \;\|\!\!-\!\!\nearrow\!\!\searrow & \qquad\qquad \text{oxido-reducere} \\ 4\,CH_3.CHO & O & 4\,CH_3.COOH \end{array}$$

Din produsele de degradare inductivă a moleculei de zahar şi din acelea ale fermentaţiei butirice, aceto-alcoolice şi aceto-hidrogenice iau naştere astfel alte produse, cum este metanul.

Formarea metanului nu poate fi deci concomitentă, paralelă cu aceea a hidrogenului, ci ea urmează acestuia, luînd naştere pe contul lui, prin reducerea bioxidului de carbon sau decarboxilarea acidului acetic. Apar

astfel procese fermentative secundare, care succed acelora de fermentaţie butirică şi aceto-alcoolică, care sînt procese fermentative principale.

Ansamblul acestor fermentaţiuni principale şi secundare se conjugă asociindu-se, pentru a da naştere la următoarele fermentaţiuni complexe:

a. În cazul degradării inductive a moleculei de zahăr:

$$2\,C_6H_{12}O_6 + 4\,H_2O \rightarrow 4CH_3.COOH + 3\,CO_2 + 2\,H_2O + CH_4 + 4\,H_2 \quad \text{(prin oxido-reducere)}$$

$$2\,C_6H_{12}O_6 + 4\,H_2O \rightarrow 4\,CH_3.COOH + 2\,CO_2 + 4\,H_2O + 2\,CH_4 \quad \text{(prin oxido-reducere şi reducere)}$$

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CH_3.CH_2.OH + 2\,CO_2 \quad \text{(prin reducere)}$$

$$2\,C_6H_{12}O_6 + 4\,H_2O \rightarrow 4\,CH_4 + 4CO_2 + 4\,H_2O + 2CH_4 \quad \text{(prin reducere şi decarboxilare)}$$

b. În cazul fermentaţiei butirice:

$$2C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2\,CH_3.CH_2.CH_2.COOH + 2H_2O + 3CO_2 + CH_4 \quad \text{(prin reducere)}$$

c. În cazul fermentaţiei aceto-alcoolice:

$$2\,C_6H_{12}O_6 + 2\,H_2O \rightarrow 2\,CH_3.COOH + 2CH_3.CH_2OH + 3\,CO_2 + CH_4 + 2\,H_2O \quad \text{(prin reducere)}$$

$$C_6H_{12}O_6 + H_2O \rightarrow CH_4 + CO_2 + CH_3.CH_2OH + 2\,CO_2 + 2\,H_2 \quad \text{(prin decarboxilare)}$$

$$\begin{cases} 2\,C_6H_{12}O_6 + 2\,H_2O \rightarrow 2\,CH_4 + 2\,CO_2 + 2\,CH_3.CH_2OH + 3\,CO_2 + 4\,H_2 + CH_4 + 2\,H_2O \\ \qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad \text{(prin reducere şi decarboxilare)} \\ 2\,C_6H_{12}O_6 + 2\,H_2O \rightarrow 2\,CH_4 + 2\,CO_2 + 2\,CH_3.CH_2OH + 2\,CO_2 + 2\,CH_4 + 4\,H_2O \end{cases}$$

Degradarea anaerobă a celulozei sub acţiunea bacteriilor Cellulosae hidrogenicus şi metanicus se desfăşoară deci în etape succesive, unde formarea metanului apare ca un proces fermentativ secundar, subordonat formării prealabile a aldehidei acetice, a bioxidului de carbon şi a hidrogenului şi nici de cum ea nu apare ca un proces concomitent şi asociat acestuia din urmă.

După această concepţie, degradarea anaerobă a celulozei are şi un caracter specific şi unul unitar cu procesele de degradare respiratorie a celorlalte microorganisme, care folosesc substanţele hidrocarbonate.

În modul cum prezentăm procesul de degradare anaerobă a celulozei, credem că încep să se risipească inadvertenţele şi unele erori referitoare la natura acestui proces (2).

III. Tot astfel, cercetările de pînă acum, referitoare la formarea acizilor humici în sol, au arătat care este natura substanţelor care participă la această formare, şi în ce constă mecanismul acestei formări. S-a stabilit astfel, cum am văzut, că fenolii sînt substanţele de bază ale formării acizilor humici (5).

În cercetările referitoare la formarea fenolilor prin sinteză microbiană, Flaig arată că fenolii la rîndul lor pot lua naştere nu numai pe contul acizilor alifatici şi al acetaţilor, ci şi pe contul substanţelor hidrocarbonate (6), (7).

Nu rezultă însă din cercetările efectuate pînă acum în ce constă participarea glucidelor şi mai ales a celulozelor din materia organică a solului, la construcţia edificiului molecular al fenolilor. Din cercetările efectuate pînă acum nu rezultă nici mecanismul de formare al fenolilor în sol prin sinteză microbiană. Acest mecanism dat de noi arată că — diferit la începutul lui, după natura substanţei care se transformă, — el este unitar, ducînd la floroglucină şi de aici la diferiţi fenoli (5).

Prezentat la redacţie la 19 decembrie 1973

Institutul agronomic „N. Bălcescu" Bucureşti

ON THE ANAEROBIC DEGRADATION OF STARCH AND CELLULOSE

SUMMARY

The acetopropionic fermentation of starch, whose chemical mechanism has not been elucidated so far, is preceded by three simpler fermentative processes — lactic, acetoalcoholic and acetohydrogenic — which are associated and correlated.

The anaerobic degradation of cellulose, considered as an association of two distinct and parallel processes, one methanic and the other hydrogenic, represents in fact a process of butyric fermentation and one of acetoalcoholic fermentation; the hydrogen resulting from these fermentations subsequently reduces the carbon dioxide, yielding methane; the formation of methane is thus subordinate and not parallel to the previous formation of hydrogen.

The acetopropionic fermentation of starch and the acetobutyric fermentation of cellulose are closely related forming a unity, which is characteristic of all the respiratory processes.

BIBLIOGRAFIE

1. M. Ionescu, *Biochimia agricolă*, Ed. Ceres, 1970, Bucureşti.
2. M. V. Fedorov, *Microbiologia solului*, Ed. Agro-Silvică, Buc. 1957.
3. F. Soare, *Microbiologia solului*, Ed. Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 1966.
4. I. Verplanke, *Microbiologie*, Bruxelles, 1932.
5. M. Ionescu, St. cerc. Biochim., **16**, 317, 1973.
6. W. Flaig, Soil Sci., **111**, 19, 1971.
7. W. Flaig, *Neuere Ergebnisse über Bildung und Chemie von Huminstoffen*, C.I.D.A.S., Bucureşti, 1973 (sub tipar).

ST. CERC. BIOCHIM., 17, 2, 165—170 (1974)

ACȚIUNEA MOLIBDENULUI ASUPRA ACTIVITĂȚII UNOR ENZIME DIN FICAT LA PĂSTRĂVUL CURCUBEU (*SALMO GAIRDNERI*)

VALENTINA JURCA

Rezumat. — Molibdenul adăugat în hrana artificială a păstrăvilor determină modificări ale activității hexokinazei (ATP : D-glucozo-6-fosfotransferaza, EC.2.7.1.2.), glutamat-oxalacetat transaminazei, (L-aspartat 2-oxo-glutarat aminotransferaza, EC.2.6.1.1.) și a succinoxidazei (succinat oxidoreductaza, EC.1.99.1.) din ficat, dependente pe de o parte de concentrația acestui element, iar pe de altă parte de conținutul de proteine din hrană.

Identificarea molibdenului ca parte integrantă a enzimei xantinoxidaza, metaloflavoproteidă de primă importanță în procesele metabolice vitale [1], a confirmat concluzia că acest element este absolut necesar nutriției animalelor [2,3]. Mai tîrziu s-a semnalat interferența molibdenului cu metabolismul glucidelor [4], purinelor [5] și al diferitelor elemente minerale, cum sînt calciul [6], zincul [7] și cuprul [8].

O seamă de cercetători (citați de 9) constată că molibdenul administrat în doze mari este toxic, provocînd moartea animalelor de experiență. Cunningham [10] ajunge la concluzia că toxicitatea molibdenului se datorește aportului incorect de sulf și cupru din alimentație. Mai mulți cercetători, citați de Miller și Engel [11], emit părerea că printre factorii ce determină toxicitatea unor metale pare a fi conținutul de proteine din alimentație, efect demonstrat de acești autori pentru seleniu și cadmiu.

Pe baza acestor considerente ne-am propus să vedem în ce măsură este modificată acțiunea molibdenului de către conținutul în proteine al hranei, cercetînd influența acestui element asupra următoarelor enzime hepatice : hexokinaza, glutamat-oxalacetat transaminaza și succinoxidaza, în funcție de variațiile cantitative ale proteinei din hrană. Aceste investigații se încadrează în contextul modificărilor biochimice induse de unii componenți ai hranei artificiale la salmonide, printre care și de molibden [12] — [14]. Totodată, modificările enzimatice pot reflecta, într-un anumit grad, alterarea unor procese metabolice, ca o consecință a unor regimuri dezechilibrate întîlnite frecvent în practică

MATERIAL ȘI METODE

Experiențele au fost efectuate pe păstrăvi de aceeași vîrstă (P_2+) împărțiți în șase loturi a cîte 50 de exemplare. Fiecare lot experimental a fost pus în bazin separat, în condiții de viață obișnuite, de crescătorie, la Baza experimentală piscicolă Tarcău-Piatra Neamț.

La prima serie de trei loturi s-a administrat o rețetă furajeră RT_4, realizată și experimentată de noi anterior, cu un conținut de proteine de 50,20% și a cărei compoziție este dată într-o lucrare precedentă [13].

În a doua serie de trei loturi s-a întrebuințat aceeași rețetă furajeră, numai că proporția de proteină a fost redusă la 28,70% prin micșorarea cantității de făină de pește și înlocuirea ei cu făină de grîu integrală și cu făină de gozuri.

La fiecare din cele două serii de experiențe, un lot a servit drept martor (fără molibden), alt lot a primit în hrană molibden sub formă de molibdat de amoniu în raport de 1,26 mg/kg furaj, calculat în molibden, cantitate optimă stabilită experimental [13], și în sfîrșit un lot a primit în hrană molibden în cantitate de cinci ori mai mare față de cea precedentă (6,30 mg/kg hrană).

La 35 de zile de la începerea experienței s-au sacrificat animalele prin decapitare, ficatul a fost scos imediat, cîntărit și omogenizat la gheață în manitol 0,25 M. Hexokinaza și glutamat-oxalacetat transaminaza au fost determinate în supernatantul obținut din omogenatul 25%, centrifugat timp de 10 min la 2 000 rot/min, la temperatura de 0°C, iar succinoxidaza în mitocondrii. Acestea s-au obținut după procedeul descris într-o lucrare anterioară [15]. Activitatea hexokinazei s-a evaluat prin determinarea cantității de glucoză rămasă nefosforilată conform metodei indicate de Zaharin [16], rezultatele au fost exprimate în fosforilare la %. Glutamat-oxalacetat transaminaza s-a măsurat cu metoda lui Bruyet [17] adaptată la omogenatul hepatic, exprimînd activitatea enzimatică în micromoli piruvat. Succinoxidaza s-a determinat cu metoda convențională Warburg, utilizînd succinatul ca substrat [18], rezultatele s-au exprimat în microatomi de oxigen pe mg proteină/oră. Proteina mitocondrială s-a determinat cu ajutorul metodei Lowry [19].

REZULTATE ȘI DISCUȚII

În tabela 1 sînt prezentate datele referitoare la influența molibdenului asupra activității hexokinazei și transaminazei glutamat-oxalacetice din omogenatul de ficat de la animalele care au primit în hrană concentrații variabile din acest element și de proteine, în comparație cu martorii. După cum reiese din tabelă, într-un regim cu un conținut optim de proteină (50,20%) și de molibden (1,26 mg/kg hrană), activitatea hexokinazei și aceea a glutamat-oxalacetat transaminazei prezintă valori aproape duble în raport cu cele găsite la lotul martor. În cazul aceluiași conținut de molibden din hrană și al unui procent mai mic de proteine (28,70%), activitatea acestor enzime scade apreciabil față de valorile găsite la martor. Prezența molibdenului în cantitate de cinci ori mai mare față de 1,26 mg/kg hrană a provocat scăderea activității acestor enzime, însă într-un grad diferit, în funcție de conținutul de proteină din hrană. Astfel, la un regim cu 50,20% proteină, intensitatea de fosforilare a glucozei de către hexokinază scade cu 39,5%, iar la un regim cu 28,70% proteină cu 95,0%; pentru glutamat-oxalacetat transaminaza, diminuarea activității enzimatice este de 30,8%, respectiv 84,7%.

Tabela 1

Acţiunea molibdenului asupra hexokinazei (I) şi glutamat-oxalacetat transaminazei (II) din ficat, la păstrăvul curcubeu (Salmo gairdneri) în funcţie de conţinutul de proteine din hrană)*.

Cantitatea de proteină din hrană, %	Molibden, mg/kg hrană	(I) Glucoza în micromoli/g ţesut: Inactiv M ± m	(I) Glucoza în micromoli/g ţesut: Activ M ± m	(I) Fosforilarea, %.	(I) Creşterea (+) sau scăderea (—) fosforilării, %faţă de martori	(II) Micromoli piruvat/mg ţesut M ± m	(II) Creşterea (+) sau scăderea (—), %
50,20	—	32,80 ±0,89	20,10 ±0,78	37,18	—	769 ±35	—
50,20	1,26	31,80 ±1,02	9,50 ±0,48	70,12	+88,5	1367 ±48	+77,7
50,20	6,30	35,09 ±0,93	27,19 ±0,76	22,48	—39,5	532 ±52	—30,8
28,70	—	29,12 ±0,83	24,18 ±0,65	16,96	—	490 ±35	—
28,70	1,26	27,32 ±0,73	26,45 ±0,55	3,14	—81,4	230 ±26	—70,0
28,70	6,30	37,56 ±0,64	37,24 ±0,71	0,85	—95,0	117 ±43	—84,7

*) Rezultatele reprezintă media a zece determinări

Activitatea succinoxidazei (fig. 1) din mitocondriile de ficat a evoluat asemănător cu aceea a hexokinazei şi transaminazei glutamat-oxalacetice, adică a fost mai mare la lotul cu o dietă corespunzătoare

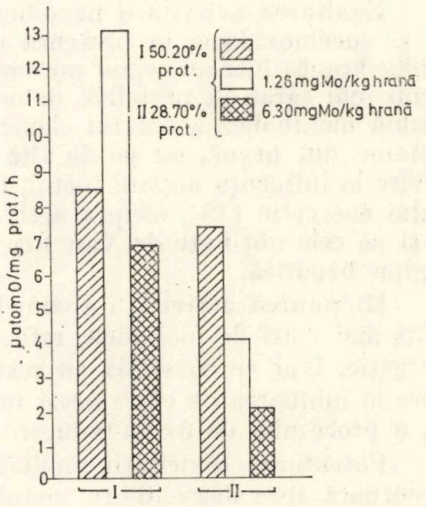


Fig. 1. — Acţiunea molibdenului asupra activităţii succinoxidazei din mitocondriile hepatice de păstrăv (Salmo gairdneri) în funcţie de conţinutul de proteine din hrană.

la 50,20% proteină şi 1,26 mg molibden/kg hrană, şi mai scăzută la lotul cu un regim alimentar ce conţinea 28,70% proteină, în comparaţie cu martorii. La creşterea cantităţii de molibden în hrană, activitatea succin-

oxidazei scade vertiginos în cazul regimului cu un conţinut mai redus de proteină (28,70%), comparativ cu martorii.

Paralel cu reducerea activităţii enzimelor din ficat, la lotul căruia i s-a administrat hrană cu un nivel mai scăzut de proteină şi cu un conţinut mai mare de molibden a apărut mortalitatea păstrăvilor în săptămîna a patra, într-un procent de 5%, crescînd vertiginos, spre cea de-a şaptea săptămînă, cînd a atins 75%.

Remarcăm, pe de altă parte, că o scădere parţială a proteinelor din hrană provoacă micşorarea activităţii enzimelor investigate, însă într-o măsură mai mică decît adăugarea molibdenului (tabela 1 şi fig. 1).

Din analiza rezultatelor prezentate se desprind două aspecte referitoare la răspunsul enzimelor investigate, unul legat de cantitatea de proteine, celălalt legat de conţinutul de molibden din hrană. Constatarea că succinoxidaza prezintă valori mai scăzute în regimul mai sărac în proteine confirmă datele din literatură care indică o scădere a nivelului unor componenţi ai lanţului transportor de electroni [20], ca răspuns la deplеţia proteică, în cazul experimentării pe şobolani tineri. Valoarea mai mică a activităţii hexokinazei, constatată de noi în regimul cu un conţinut mai scăzut de proteină, indică o diminuare a intensităţii metabolismului anaerob, verigă ce condiţionează energia căilor metabolice majore. Activitatea mai scăzută a glutamat-oxalacetat transaminazei, enzimă care în afara rolului său în sinteza aminoacizilor are şi un rol în transformarea acestora în surse de energie uşor oxidabile sau în gluconeogeneză, sugerează că modificările activităţii enzimei din metabolismul azotului pot fi interpretate ca răspunsuri adaptive, care contribuie la menţinerea homeostaziei, prin reducerea ratei de catabolizare a proteinelor.

Exaltarea activităţii hexokinazei, glutamat-oxalacetat transaminazei şi succinoxidazei în prezenţa unei cantităţi mici de molibden (1,26 mg/kg hrană) într-un regim normoproteic şi diminuarea acestora într-un regim mai sărac în proteină, demonstrează pe de o parte că cantitatea optimă metabolică a acestui element este condiţionată de conţinutul de proteine din hrană, iar pe de altă parte confirmă rezultatele noastre cu privire la influenţa acestui metal, în concentraţii mici, asupra metabolismului energetic [18], asupra activităţii fosfatazei bazice din sînge [14], ca şi pe cele obţinute de Van Reen şi Pearson [21] asupra fosfatazei de origine hepatică.

Micşorarea activităţii enzimelor investigate, în prezenţa unei cantităţi mai mari de molibden, reflectă un nivel scăzut al metabolismului energetic, fapt ce concordă cu rezultatele obţinute in vitro [18], referitoare la inhibarea de către acest metal, în anumite limite de concentraţie, a procesului de oxido-reducere celulară.

Potenţarea toxicităţii molibdenului, reflectată prin evoluarea mai accentuată spre dezechilibru metabolic într-un regim mai sărac în proteină, ar putea să fie legată de crearea posibilităţii de stocare a acestui element în ficat şi de eliminare a lui în cazul unei alimentaţii bogate în proteină. Verificarea acestei ipoteze constituie obiectul cercetărilor noastre viitoare.

CONCLUZII

— Un conținut de proteină mai mic decît cel considerat normal în hrana artificială a păstrăvilor produce scăderea activității hexokinazei, glutamat-oxalacetat transaminazei și succinoxidazei din ficat

— Molibdenul adăugat în cantitate de 1,26 mg/kg hrană la un regim considerat normoproteic (50,20% proteină) intensifică activitatea hexokinazei, glutamat-oxalacetat transaminazei și a succinoxidazei, iar într-un regim mai sărac în proteină (28,70%) diminuează activitatea acestor enzime.

— Molibdenul în cantitate de cinci ori mai mare decît cea precedentă (6,30 mg/kg hrană) produce scăderea activității acestor enzime în măsură cu atît mai accentuată cu cît regimul alimentar este mai sărac în proteine.

— Relația dintre acțiunea molibdenului asupra activității enzimatice și conținutul proteinelor din hrană relevă că un regim sărac în proteină favorizează toxicitatea acestui element.

Prezentată la redacție 8 ianuarie 1974

Laboratorul de biochimie
Universitatea „Al.I. Cuza" Iași

THE ACTION OF MOLYBDENUM UPON THE ACTIVITY OF SOME ENZYMES IN TROUT (*SALMO GAIRDNERI*) LIVER

SUMMARY

The smaller content of proteins in the artificial food of trouts in comparison with that considered normal, produces the modification of the activity of hexokinase, glutamate-oxalacetate transaminase and of succinoxidase from liver. The molybdenum added in quantity of 1,26 mg/kg of food at a diet considered normoproteic (50.20% mg proteins) enhances the activity of enzymes : hexokinase, glutamate-oxalacetate transaminase, succinoxidase, while in a poorer regim of proteins (28.70%), establishes a decrease of this enzymatic activity. The molybdenum added in a greater quantity (6.30 mg/kg of food) produces the modification of this enzymatic activity, but the more the stress the poorer in proteins is the food regime. The relation between the action of molybdenum upon the enzymatic activity and the content of proteins in food, points out that a poor regime of proteins favours the toxicity of this element.

BIBLIOGRAFIE

1. E. C. De Renzo, Arch. Biochem. Biophys., **45**, 247 (1953)
2. J. D. Teresi, C. A. Elvehem, E. B. Hart, Amer. J. Physiol., **137**, 504 (1942)
3. F. Coujolle, D. Meyneer, Toulouse Médicale, **52**, 741, (1952)

4. F. I. Rerenstein, S. V. Sapojcov, V. N. Holod, Nauchin, Dokl. Vysshey Skoly. Biol., **1**, 70 (1966)
5. E. V. Gusev, Ghighi. i sanit., **9**, 63 (1969)
6. J. E. Evans, G. K. Davis, Animal Sci., **25**, 1010 (1960)
7. V. M. Holod, G. E. Spak, Khimizatsia Selsk. Khol. **6**, 699 (1968)
8. A. T. Dick, Soil Science, **81**, 229 (1956)
9. L. Vignoli, J. P. Defretin, Biol. Médicale, **LII**, 319 (1963)
10. I.J. Cunningham, New Zealand J. Agr. Research., **90**, 196 (1955) şi **95** 218 (1957)
11. R. F. Miller, R. W. Engel, Fed. Proc., **19**, 666 (1956)
12. V. Jurca, An. St. Univ. Iaşi, s.I.c., **XIII**, 213 (1967)
13. V. Jurca, D. Matei, An. St. Univ. Iaşi, s.I. c. **XIII**, 105 (1967)
14. V. Jurca, An. St. Univ. Iaşi, s.c.I.c.**XIV**, 113 (1968)
15. V. Jurca, An. St. Univ. Iaşi s.I.c.**XIV**, 121 (1968)
16. Iu. L. Zaharin, Biochimia, **16**, 562 (1951)
17. P. Bruyet, Ch. Meignien-Gauthier, A. Delaunay, Ann. Biol. Clin., **16**, 661 (1958)
18. V. Jurca, St. cerc. biochim. sub tipar
19. O. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall, J. Biol. Chem. **193**, 265 (1951)
20. K. Murmatsu, K. Ashida, J. Nutrition, **76**, 143 (1962)
21. R. Van Reen, P. B. Pearson, Fed. Proc. **13**, 314 (1954)

ST. CERC. BIOCHIM., 17, 2, 171–175 (1974)

STUDIUL COMPARATIV AL PROTEINELOR DIN SERUL SANGUIN LA UNELE SPECII ŞI LINII DE CIPRINIDE

VALENTINA JURCA, CLEOPATRA MATEI şi DUMITRU MATEI

Rezumat. — S-au cercetat cu ajutorul electroforezei în gel de poliacrilamidă proteinele serice la mai multe specii şi linii de ciprinide, evidenţiindu-se polimorfismul acestor proteine. Se discută trăsăturile comune şi deosebirile specifice ale proteinogramelor la nivel intra şi interspecii.

Moleculele proteinelor fiind unităţi morfologice principale ale corpului animal, la nivel molecular de organizare, forma şi structura lor constituie, după Sibley [1], surse de informaţii genetice şi filogenetice, ca şi muşchii, oasele, pielea şi alte organe şi ţesuturi, deoarece acestea însele sînt formate în mare măsură sau în întregime din molecule proteice. În prezent [2] este bine stabilit că informaţiile genetice codificate în molecula ADN sînt traduse printr-o serie de reacţii în structura proteinelor.

După mai mulţi cercetători [3,4], aplicarea fracţionării şi a studiului structurii proteinelor la probleme taxonomice şi filogenetice, în scopul general al sistematicii biochimice, atrage din ce în ce tot mai mult atenţia cercetătorilor. În acest context, Sibley [5] a studiat peste cinci mii de profiluri de proteine ovulare la păsări, utilizînd electroforeza pe hîrtie, iar Desseur şi Fox [6], utilizînd aceeaşi metodă, au examinat proteinele plasmatice la aproximativ 100 de specii de amfibii şi reptile. Rezultatele cercetărilor au permis stabilirea unor caractere specifice ale proteinelor, în funcţie de specie.

La peşti, studii de acest gen s-au efectuat într-o gamă mult mai restrînsă. Sulya [7] a cercetat proteinele plasmatice la rechini şi la unele specii de peşti din golful Mexic. Gunter [8], Drihlon şi şcoala sa [9], ocupîndu-se de compoziţia proteinelor plasmatice la unele specii de peşti, demonstrează caracterul lor eterogen şi constată că ele descresc în complexitate şi în cantitate la peştii inferiori, faţă de cei superiori.

Cercetările noastre anterioare [10] au pus în evidenţă relaţii de unitate şi diversitate a proteinelor solubile în embriogeneza unor specii de ciprinde, ca expresie a evoluţiei biochimice în ontogeneză. S-a stabilit că proteinele au suferit un proces de evoluţie moleculară şi am prezentat corelaţiile dintre polimorfismul lor şi raporturile ontogenetice dintre specii, în diferite stadii ale dezvoltării embrionare.

Prezenta lucrare are ca scop caracterizarea proteinelor sanguine ale unor specii şi linii de ciprinide ce populează apele ţării noastre. Inten-

ţia lucrării este, aşadar, să stabilească trăsăturile comune şi particularităţile specifice ale proteinelor, precum şi aria de extindere a polimorfismului acestora la nivelul inter şi intraspecie.

MATERIAL ŞI METODĂ

S-au luat în studiu speciile *Ctenopharingodon idella*, *Hypophthalmichthys molitrix*, *Aristhichthys nobilis*, *Cyprinus carpio* sălbatic şi de cultură (linia ucraineană, linia iugoslavă şi o linie autohtonă obţinută în anul 1953 la Staţiunea experimentală piscicolă Nucet, prin încrucişarea de absorbţie a crapului sălbatic indigen, de Siutghiol, cu crapul de cultură rasa Lausitz; acest crap autohton ameliorat a fost transportat în Moldova la Baza experimentală piscicolă Podu Iloaiei, unde i s-a urmărit stabilitatea, obţinîndu-se forma de heterosis (F_4)).

Exemplarele de peşti necesare cercetărilor s-au obţinut din heleşteele Bazei experimentale piscicole Podu Iloaiei. Peştii supuşi experienţelor au fost imaturi sexual, de aceeaşi vîrstă (1 +), de greutate aproximativ egală în cadrul aceleiaşi specii sau linii, prezentînd în medie dimensiunile înscrise în Tabela 1.

Tabela 1

Dimensiunile peştilor aparţinînd speciilor şi liniilor de ciprinide luate în studiu (valori medii).

Specia sau linia		Lungimea (în cm)	
		mare	mică
Ctenopharingodon idella	(18)	38,27	35,44
Aristhichthys nobilis	(16)	32,90	31,07
Hypophthalmichthys molitrix	(15)	31,80	29,05
Cyprinus carpio sălbatic	(8)	23,40	20,60
Cyprinus carpio de cultură linia ameliorată autohtonă	(18)	26,85	24,64
Cyprinus carpio de cultură linia ucraineană	(14)	29,08	27,00
Cyprinus carpio de cultură linia iugoslavă	(17)	30,00	27,09

Cifrele din paranteză reprezintă numărul de exemplare luate în experienţe.

Imediat după pescuire, s-a îndepărtat, prin ştergere, excesul de apă de pe suprafaţa peştelui, după care s-a colectat sînge din artera caudală, prin rezecţia cozii. Probele de sînge au fost luate în perioada mai — august.

Pentru separarea proteinelor serice s-a utilizat tehnica electroforezei în strat subţire, descrisă de Akroyd [11] şi modificată [12]. S-a folosit ca mediu de migrare un gel cu o concentraţie de 5% acrilamidă-bisacrilamidă în tampon TRIS-EDTA borat, la pH 7,15 pe plăci de 13 × ×8 cm. Pentru fiecare probă s-au aplicat 0,05 ml ser nehemolizat, migrarea s-a realizat la 4° C, sub o tensiune de 350 V şi cu o intensitate de 25 mA, timp de două ore şi 35 min.

Fracţiunile proteice au fost revelate cu o soluţie de amidoschwarz 0,5% în acid acetic 5%. Decolorarea s-a făcut prin spălări succesive cu acid acetic 5%.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

La ciprinidele investigate, proteinele serului sanguin se caracterizează printr-o serie de particularităţi referitoare la eterogenitatea, mobilitatea electroforetică şi raporturile cantitative dintre diferitele fracţiuni. Diferenţele evidenţiate la nivelul acestor indici sînt caracteristice atît speciilor cît şi liniilor din interiorul aceleiaşi specii. Într-adevăr, modelele proteinogramelor speciilor şi liniilor luate în studiu, prezentate în figura 1, ilustrează o marcantă lipsă de uniformitate. Eterogenitatea spectrelor electroforetice ale proteinelor serice evidenţiază grade variate, atît la nivelul speciilor cît şi al liniilor cu toate că electroforegramele acestora din urmă (fig. 1 S, U, I, N) manifestă o mai mare omogenitate intraspecie. Numărul fracţiunilor proteice variază între 11 şi 15. Astfel, la specia *Aristhichthys nobilis* s-au relevat 11 fracţiuni (fig. 1 A), la specia *Hypophthalmichthys molitrix* 12 fracţiuni (fig. 1 M), la speciile *Ctenopharingodon idella*, *Cyprinus carpio* sălbatic şi linia iugoslavă (fig. 1 C, S, I) se remarcă prezenţa a 14 fracţiuni, iar la *Cyprinus carpio* linia ucraineană şi linia ameliorată autohtonă (fig. 1 U,N) se disting cîte 15 fracţiuni. Datele obţinute relevă existenţa unor forme moleculare multiple ale proteinelor din serul sanguin, la speciile şi liniile de peşti cercetate.

Din punctul de vedere al migrării electroforetice şi al raporturilor cantitative dintre diferitele tipuri de proteine nu se pot stabili criterii precise. Ca o remarcă generală, se constată că fracţiunile proteice cu migrare anodică posedă un grad de mobilitate mai omogen la nivelul liniilor (fig. 1 U, I, N), în timp ce la nivelul speciilor (fig. 1 C, N, A, S) ele prezintă o distribuţie şi localizare mai diferită.

La speciile *Aristhichthys nobilis*, *Hypophalmichthys molitrix* şi *Cyprinus carpio* sălbatic (fig. 1 A, M, S), spectrele electroforetice ale proteinelor serice prezintă în general o mobilitate mai mică în cîmpul electroforetic. În cazul acesta se poate admite că proteinele acestor peşti posedă o încărcare electrică inferioară, ceea ce ar însemna că ar fi mai sărace în grupări carboxilice ionizabile la pH 7,15.

Repartiţia proteinelor serice în funcţie de mobilitatea electroforetică oglindeşte, de fapt, o specificitate de specie şi de linie. Sub acest aspect, fiecare specie şi fiecare linie prezintă anumite particularităţi ale modelului proteinogramei, fapt ce sugerează existenţa unui anumit grad de conservare a unor trăsături moleculare ale proteinei respective.

Este demn de subliniat că din punct de vedere al mobilităţii electroforetice proteinele serice ale speciilor de ciprinide manifestă un paralelism destul de marcat cu ale proteinelor solubile din stadiul dezvoltării embrionare, cercetate de noi anterior [10]. La una şi aceeaşi specie, proteinele provenite din ţesuturi profund deosebite ca funcţie, constituţie şi structură prezintă trăsături comune în ce priveşte comportarea în cîmpul electroforetic.

Ca o trăsătură comună tuturor proteinogramelor aparţinînd speciilor şi liniilor de ciprinide cercetate, se remarcă prezenţa în cantitate mai mare a fracţiunilor cu migrare intermediară în raport cu celelalte fracţiuni. Pe de altă parte, aceste fracţiuni ce corespund α şi β globulinelor clasice [13, 14], variază numeric şi cantitativ cu specia şi linia peştilor. Polimorfismul lor este desigur legat de rolul deosebit pe care haptoglobinele şi în special β globulinele siderofilinice îl au în transmiterea ereditătii [15]. Acest lucru ar explica stabilitatea morfo-anatomică caracteristică speciilor şi chiar liniilor din interiorul aceleiaşi specii.

Proteinograma serului sanguin al liniei ameliorate autohtone de *Cyprinus carpio* (fig. 1 N), prezintă asemănări cu a crapului sălbatic (fig. 1 S) în porţiunea dinspre catod şi cu a liniei ucrainene (fig. 1 U) în partea dinspre anod, atît în privinţa distribuirii cît şi a numărului de fracţiuni. Constituţia comună a unor tipuri de proteine din serul sanguin al liniei ameliorate autohtone şi din acela al crapului sălbatic şi de cultură vin în sprijinul explicării calităţilor sale superioare atît din punct de vedere biologic cît şi economic. Acest peşte este rezistent la boli, la frig (calităţi caracteristice crapului sălbatic) posedă o prolificitate ridicată şi un înalt ritm de creştere (indici specifici crapului de cultură). Datorită acestor calităţi, linia ameliorată autohtonă de *Cyprinus carpio* s-a dovedit ca cea mai adecvată pentru condiţiile ecologice din Moldova.

Datele referitoare la unele caracteristici ale proteinogramelor aparţinînd formelor parentale ale liniei de *Cyprinus carpio* ameliorate autohtone, fiind insuficiente în prezent, vor constitui obiectul unei lucrări viitoare. Ele vor evidenţia că polimorfismul proteinelor serice poate fi utilizat ca index genetic.

CONCLUZII

Proteinele din serul sanguin al ciprinidelor prezintă un polimorfism atît la nivelul speciilor cît şi la nivelul liniilor ce aparţin aceleiaşi specii. Acest polimorfism se manifestă la nivelul fracţiunilor cu migrare intermediară.

Proteinogramele serice, pe lîngă unele trăsături comune, prezintă diferenţe interesînd gradul de eterogenitate, mobilitatea electroforetică şi raporturile cantitative dintre diferitele tipuri de proteine, în funcţie de specia şi linia peştilor.

Proteinele serice aparţinînd liniilor de ciprinide prezintă în general un grad mai mare de omogenitate în privinţa mobilităţii electroforetice, comparativ cu ale speciilor.

Prezentat la redacţie la 28 noiembrie 1973.

Universitatea „Al.I. Cuza" Iaşi
şi
Staţiunea experimentală piscicolă
Iaşi

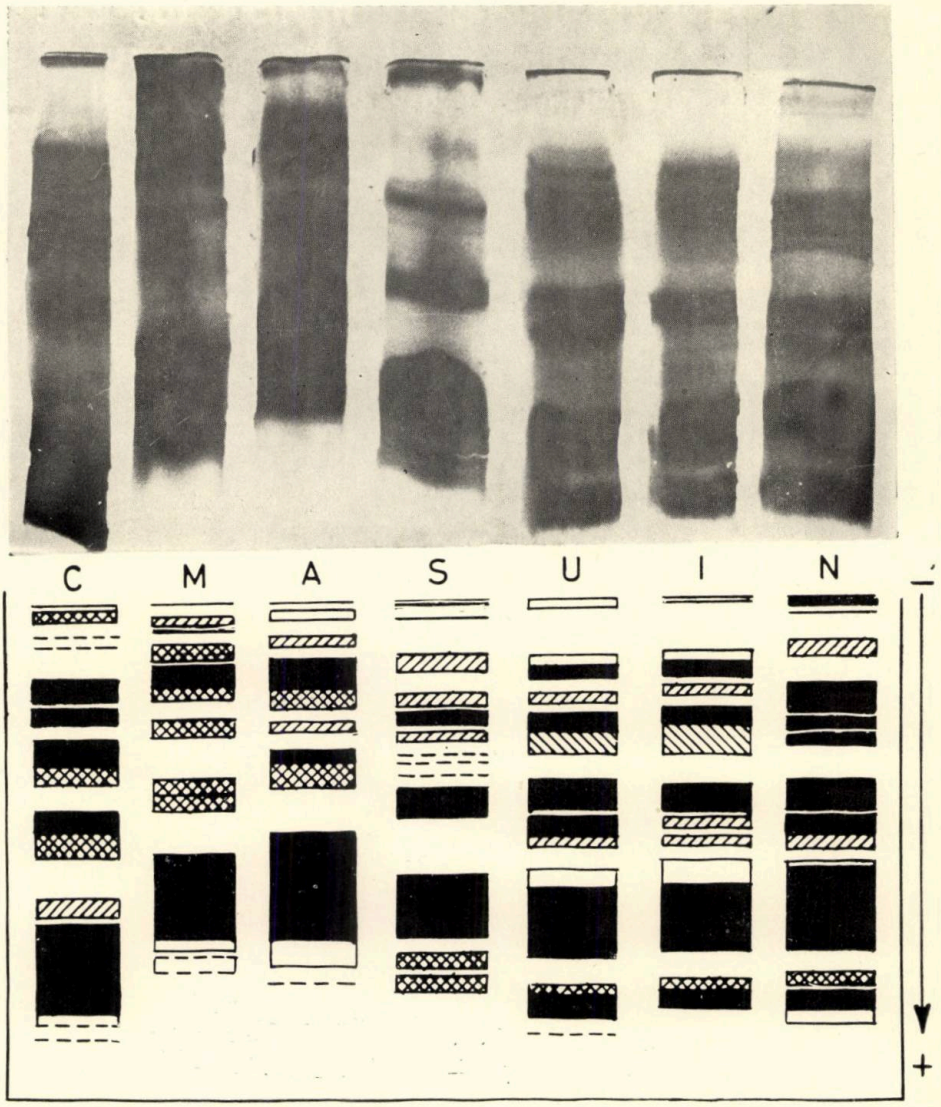


Fig. 1. Modelele proteinogramelor din serul sanguin al unor specii şi linii de ciprinide
C – Ctenopharyngodon idella; M – Hypophthalmichthys molitrix; A – Aristhichthys nobilis; S – Cyprinus carpio sălbatic; U – Cyprinus carpio de cultură linia ucraineană; I – Cyprinus carpio de cultură linia iugoslavă; N – Cyprinus carpio de cultură linia ameliorată autohtonă.

COMPARATIVE STUDY OF THE SERUM PROTEINS IN SOME SPECIES AND LINES OF CYPRINIDAE

SUMMARY

Using the electrophoresis method in polyacrylamide gel the serum proteins of the following species were studied : *Ctenopharyngodon idella*, *Hypophthalmichthys molitrix*, *Aristhichthys nobilis*, the wild *Cyprinus carpio* and cultured *Cyprinus carpio*, yugoslav line, ukrainian line and an improved native line. The polymorphism of serum proteins both in species case and in the case of cyprinidae lines was pointed out. This is shown especially at the level of fractions with intermediate migration. Electrophoretical spectra present also, besides common features, certain variations with regard to heterogeneity, electrophoretic mobility and quantitative ratios between different types of proteins, depending on the species and the line of fish.

BIBLIOGRAFIE

1. C. G. Sibley, Systematic Zoology, **11**, 108 (1962).
2. M. W. Nirenberg, J. H. Matthaei, O. W. Jones, R. G. Martin, S. H. Barondes, Fed. Proc., **22**, 55 (1963).
3. S. Ochoa, Fed. Proc., **22**, 62 (1963).
4. C. Yanofsky, U. Henning, B. Carlton, Fed. Proc., **22**, 75 (1963).
5. C.G. Sibley, Sistematic Zoology, **102**, 215 (1960).
6. H. C. Dessauer, W. Fox, Science, **124**, 225 (1956).
7. L. L. Sulya, B. E. Box, G. Gunter, Amer. J. Physiol., **200**, 152 (1961).
8. G. Gunter, L. Sulya, B. E. Box, Biol. Bull., **121**, 302 (1961).
9. A. Drihlon, J. M. Fine, C. R. Soc. Biol., **157**, 1897 (1963).
10. V. Jurca, G. Cazacu, C. Cazacu, St. cerc. biochim., **16**, 29 (1973).
11. L. P. Akroyd, Anal. Biochem., **19**, 399 (1967).
12. D. Tănăsescu, N. Moldoveanu, St. cerc. biochim., **11**, 313 (1968).
13. A. Drihlon, J. M. Fine, E. Magnin, C. R. Soc. Biol., **155**, 451 (1961).
14. O. Macarie, D. Tănăsescu, N. Moldoveanu, St. cerc. biochim., **14**, 285 (1971).
15. L. Adameşteanu, A. Nicolau, H. Bârză, *Semiologie*. Ed. Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 1968, vol. I, p. 350.

ST. CERC. BIOCHIM., 17, 2, 177–183 (1974)

ADSORBȚIA PE HÎRTIE DE FILTRU A PROTEINELOR

MEDARD KEREKES și ANDREI KOVÁCS

Rezumat. — S-au studiat factorii care influențează adsorbția pe hîrtie de filtru a unor proteine, în condiții bine determinate. Proteinele studiate au fost ribonucleaza, serumalbumina, gamma-globulina și fibrinogenul. S-a pus în evidență că suprafața spoturilor proteice formate pe hîrtia de filtru, este influențată de calitatea hîrtiei, concentrația și volumul soluției aplicate pe hîrtie, respectiv de greutatea moleculară a proteinei.

Studiind comportarea proteinelor în cursul adsorbției pe hîrtie de filtru, am observat că suprafața spotului format de proteina adsorbită este proporțională cu concentrația soluției proteice. Pe baza acestei observații am elaborat o metodă pentru determinarea cantitativă a proteinorahiei [1] și am întreprins un studiu al fenomenului [2]. Observațiile noastre se corelează cu rezultatele obținute de Pristoupil [3] — [5] care a constatat o comportare asemănătoare a proteinelor pe membrane de nitroceluloză. O metodă bazată pe același principiu, însă pentru alte categorii de substanțe biologice a fost descrisă de Heinzel și colab. [6].

În domeniul cromatografiei pe hîrtie, nu s-au studiat decît factorii care determină formarea spotului în cursul migrării substanței analizate. Acest lucru se explică prin faptul că, în cromatografia pe hîrtie, rolul hotărîtor îi revine distribuției între două faze și numai în cazuri speciale adsorbției [7]. Unele aspecte ale adsorbției pe hîrtie a proteinelor au fost studiate de Simon [8]. Izotermele de adsorbție ale lui Langmuir și Freundlich sînt aplicabile numai în stări de echilibru, care însă nu se realizează la metoda întrebuințată de noi.

În lucrarea de față ne-am propus studierea mai aprofundată a fenomenului de adsorbție a proteinelor pe hîrtie de filtru și determinarea rolului unor factori care influențează adsorbția.

MATERIAL ȘI METODE

Am studiat următoarele proteine: ribonuclează din pancreas de bou, Gm = 15 000, de 4 ori cristalizată (Reanal); serumalbumină bovină, Gm = 68 000, cristalizată (NBCo); gamma-globulină din plasmă de bou, Gm = 150 000 (Schuchardt) și fibrinogen din plasmă de bou, Gm = 350 000 (BDH). Conținutul în proteine al preparatelor s-a controlat cu

reacţia biuret, cu o metodă gravimetrică (Hinsberg-Lang) şi cu metoda Kjeldahl, făcînd corecţiile necesare pentru umiditate. Din proteine am preparat soluţii cu concentraţii cuprinse între 0,04—0,25% în tampon fosfat 0,1 M cu pH 7,5. Am încercat următoarele hîrtii de filtru: Whatman 1; Macherey-Nagel 640 w, m şi d; Filtrak 388 w, m şi h; Schleicher-Schull cu bandă neagră şi Ederol nr. 1. Pe benzi de 5 cm lăţime şi lungime corespunzătoare, s-au aplicat din soluţiile proteice volume cuprinse între 10—50 µl cu micropipetă, în condiţii bine stabilite. În micropipetă se aspiră cantitatea corespunzătoare, apoi se atinge uşor hîrtia cu vîrful pipetei, ţinînd banda în poziţie orizontală. Se lasă să se scurgă încet, în timp de aproximativ 10 sec soluţia, avînd grijă ca vîrful pipetei să nu se deplaseze din poziţia iniţială. După aceasta hîrtia, aşezată pe un suport în poziţie orizontală, se ţine la temperatura camerei timp de 10 min, apoi în etuvă la 110°, timp de 20 min. Benzile au fost colorate timp de 10 min în soluţie de albastru de bromfenol 1% în etanol 96%. Excesul de colorant s-a îndepărtat prin spălare cu acid acetic 1%. S-a măsurat diametrul spotului în cazul celor circulare, respectiv diametrul mare şi cel mic în cazul spoturilor eliptice, calculînd suprafaţa în mm^2.

Trebuie notat că timpul de scurgere al soluţiei din pipetă nu are o importanţă deosebită. Variind durata aplicării între 3—22 sec, suprafeţele spoturilor au fost practic identice. Spotul umed format pe hîrtie atinge întinderea maximă la aproximativ 3 min după aplicare. Procesul este desigur limitat şi de evaporarea solventului.

Din determinări efectuate în serie reiese că rezultatele sînt bine reproductibile şi singura sursă mai importantă de eroare o constituie măsurarea diametrului spotului. Eroarea relativă a determinării suprafeţei spotului este în jur de 5%.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Dintre hîrtiile întrebuinţate cele mai potrivite s-au dovedit a fi cele cu pori mari. Rezultatele cele mai bune s-au obţinut cu hîrtia Whatman 1, pe care se formează spoturi uşor eliptice, bine conturate, repartiţia proteinei pe spot fiind uniformă. În cazul celorlalte hîrtii spoturile nu sînt omogene, forma lor fiind deseori neregulată. De pe unele hîrtii, nu poate fi îndepărtat satisfăcător excesul de colorant. Hîrtiile cu pori mici sînt cu totul necorespunzătoare. Toate rezultatele la care ne referim în continuare au fost obţinute cu hîrtie Whatman 1.

În prima serie de experienţe, am aplicat pe hîrtie soluţii proteice de diferite concentraţii, variind volumul astfel încît cantitatea de proteine să fie în toate cazurile de 20 micrograme. Am constatat că volumul soluţiei aplicate şi suprafeţele spoturilor sînt direct proporţionale (fig. 1).

În cazul ribonucleazei, proteina se repartizează practic pe întreaga suprafaţă a spotului umed, format după aplicarea soluţiei. Avînd în vedere că repartiţia proteinei pe spot este omogenă, aceasta înseamnă că forţele de atracţie intermoleculare (proteină-proteină, respectiv proteină-adsorbant) sînt relativ slabe, moleculele fiind antrenate de fluxul de lichid.

Celelalte trei proteine studiate ocupă o suprafață mai mică decît cea a spotului umed, suprafețele spoturilor fiind invers proporționale cu dimensiunile moleculelor proteice.

Într-o altă variantă, am aplicat pe hîrtie cantități diferite de proteină, în același volum de soluție (fig. 2). În cazul ribonucleazei și al albuminei, suprafața spotului atinge o valoare maximă, după care practic se plafonează.

Dacă dintr-o soluție cu o anumită concentrație se aplică volume — și prin urmare cantități de proteină — crescînde, suprafața spotului este

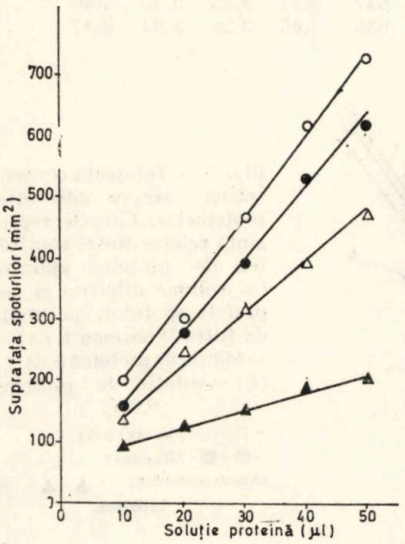


Fig. 1. — Variația suprafeței spotului proteic format pe hîrtie de filtru Whatman 1, în funcție de volumul soluției aplicate, cantitatea de proteină fiind constantă (20 µg).
– ○ – ○ – ribonuclează; –●– ● – albumină; –△–△– gamma-globulină; –▲–▲– fibrinogen.

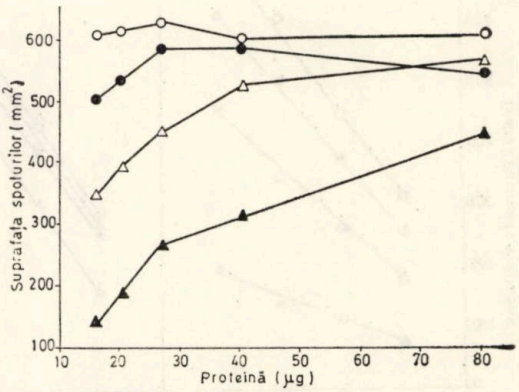


Fig. 2. — Variația suprafeței spotului proteic format pe hîrtie de filtru Whatman 1, în funcție de cantitatea de proteină, conținută în același volum (40 µl).
–○–○–ribonuclează; –●–●–albumină; –△–△– gamma-globulină; –▲–▲–fibrinogen.

direct proporțională cu volumul soluției, respectiv cu cantitatea de proteină aplicată (fig. 3). Concentrația soluției proteice influențează însă în mod hotărîtor felul adsorbției. În timp ce la concentrații între 0,04—0,066% diferențele dintre suprafețele spoturilor formate de proteinele studiate sînt evidente (fig. 3, A), la concentrațiile de 0,1% și 0,2%, diferențele tind să se egaleze, cu excepția fibrinogenului (fig. 3, B).

Aplicînd pe hîrtie aceleași volume de soluții echimoleculare de proteine, deci un număr identic de molecule, suprafețele spoturilor sînt, pentru un anumit volum, practic aceleași. În consecință și numărul de molecule calculat pe 1 mm² de suprafață exterioară a hîrtiei este foarte apropiat (tabela 1). Numărul de molecule s-a calculat cu formula

$$n/\text{mm}^2 = \frac{N.c}{M.s} \qquad (1)$$

Tabela 1

Numărul de molecule adsorbite pe 1 mm² de suprafață externă a hîrtiei de filtru Whatman 1. Concentrația soluției de proteină 7,35 × 10⁻⁶ M.

Proteină	Suprafața spotului mm²				Numărul de molecule adsorbite /mm² × 10⁻¹¹			
	Volumul soluției µl				Volumul soluției µl			
	20	30	40	50	20	30	40	50
Albumină	267	412	535	670	3,41	3,22	3,30	3,29
gamma-Globulină	261	394	542	647	3,37	3,35	3,26	3,40
Fibrinogen	180	404	547	638	4,85	3,28	3,24	3,47

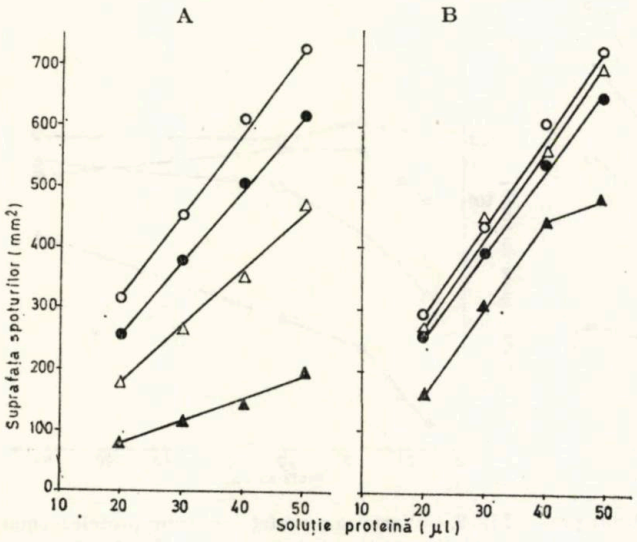


Fig. 3. — Influența concentrației asupra adsorbției proteinelor. Curbele reprezintă relația dintre cantitatea de proteină aplicată (în volume diferite) și suprafața spotului, pe hîrtie de filtru Whatman 1. (*A*) = soluție de proteină 0,04 %; (*B*) = soluție de proteină 0,2 %. –○–○– ribonuclează; –●–●– albumină; –△–△– gamma-globulină; –▲–▲– fibrinogen.

în care n este numărul de molecule pe unitatea de suprafață exterioară a hîrtiei, N numărul lui Avogadro, c cantitatea de proteină în grame, aflată în soluția aplicată pe hîrtie, M greutatea moleculară și s suprafața spotului, în mm². Rezultă deci că moleculele fibrinogenului ocupă aceeași suprafață ca cele ale albuminei și gamma-globulinei, lucru surprinzător avînd în vedere diferența relativ mare în forma moleculelor. Ecuația (1) este valabilă pentru fiecare proteină în parte, pentru o anumită concentrație, dacă se aplică pe hîrtie cantități crescînde de soluție (tabela 2).

Se observă că, în cazul ribonucleazei și al albuminei, aplicînd cantități de 2 respectiv 4 ori mai mari de proteină în aceleași volume, numărul de molecule aflat pe unitatea de suprafață crește de 2 respectiv 4 ori. Aceasta înseamnă că și stratul de proteină adsorbită se îngroașe în aceeași proporție. La gamma-globulină și fibrinogen, această regulă nu mai este valabilă.

Exprimînd suprafața din ecuația (1) obținem

$$s = \frac{N.c}{M.n}. \qquad (2)$$

Tabela 2

Numărul de molecule adsorbite pe 1 mm² de suprafață externă a hîrtiei Whatman 1, în funcție de concentrația și volumul soluțiilor de proteină.

Proteină	Conc. proteinei mg/ml	Numărul de molecule adsorbite/mm² × 10^{-11}			
		Volumul soluției de proteină µl			
		20	30	40	50
Ribonuclează	0,5	12,2	12,8	12,9	13,3
	1,0	26,7	26,8	26,7	27,6
	2,0	55,3	54,4	52,4	55,2
Albumină	0,5	3,41	3,22	3,30	3,29
	1,0	6,26	6,16	6,01	6,13
	2,0	13,2	13,4	12,9	13,5
gamma-Globulină	0,5	2,27	2,15	2,03	2,04
	1,0	3,16	3,18	3,04	3,15
	2,0	5,68	5,34	5,63	5,68
Fibrinogen	0,5	2,18	1,95	1,82	1,61
	1,0	2,78	2,40	2,21	2,27
	2,0	4,16	3,30	3,06	3,50

Avînd în vedere că N, n și c sînt constante pentru o cantitate determinată de proteină, ecuația poate fi simplificată:

$$s = \frac{k}{M} \tag{3}$$

deci, suprafața ocupată de proteină este invers proporțională cu greutatea moleculară.

Această relație este valabilă pentru toate concentrațiile și volumele studiate, în parte. Suprafața reală a spotului depinde însă în mare măsură de concentrația proteinei. Acest fenomen se datorește desigur diferenței între distanțele și în consecință și forțele intermoleculare, care la rîndul lor determină procesul de adsorbție. Figura 4 reprezintă rezultatele obținute cu soluții de 0,04%, respectiv 0,1%.

Respectînd cu rigoare condițiile experimentale, rezultatele sînt bine reproductibile. Astfel, după o standardizare corespunzătoare, procedeul ar putea servi pentru determinarea orientativă a greutății moleculare a proteinelor, în special a celor globulare, cu greutatea moleculară cuprinsă între 15 000—350 000.

Din punct de vedere metodic, procedeul întrebuințat poate fi considerat un caz special al cromatografiei pe hîrtie, în care faza staționară

este reprezentată de hîrtia de filtru, faza mobilă fiind apa, iar migrarea este radială. Durata migrării fazei mobile este însă atît de scurtă încît nu apare practic efect de eluţie, predominînd adsorbţia.

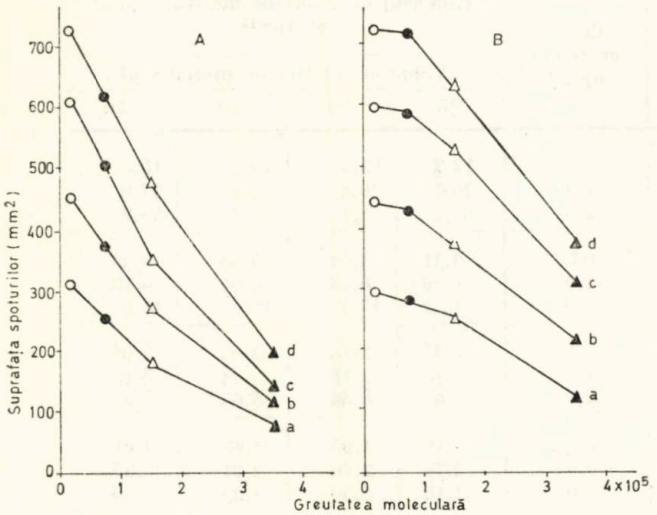


Fig. 4. — Relaţia între greutatea moleculară a proteinelor aplicate pe hîrtie Whatman 1, şi suprafaţa spotului format.
(*A*) = soluţie de proteină 0,04 %.
(*B*) = soluţie de proteină 0,1 %.
—○—○— ribonuclează; ●—●— albumină; △—△— gammaglobulină; —▲—▲— fibrinogen.
Volumul soluţiilor de proteină: *a* = 20 µl; *b* = 30 µl; *c* = 40 µl; *d* = 50 µl.

CONCLUZII

Adsorbţia proteinelor pe hîrtia de filtru este determinată de calitatea hîrtiei, concentraţia şi volumul soluţiei proteice aplicate pe hîrtie, precum şi de greutatea moleculară a proteinei.

Prezentat la redacţie
la 11 decembrie 1973

Centrul de cercetări medicale
şi
Disciplina de biochimie medicală
Institutul de medicină şi farmacie
Tîrgu-Mureş

ADSORPTION OF PROTEINS ON FILTER PAPER

SUMMARY

The factors influencing the adsorption of proteins on filter paper were investigated, under well-defined conditions. The proteins used were: ribonuclease, serum albumin, serum gamma globulin and fibrinogen. It

was shown that the areas of the spots formed by the adsorbed proteins depend on the quality of paper, concentration and volume of the solutions used, and on the molecular weight of the proteins.

BIBLIOGRAFIE

1. A. Kovàcs, M. Kerekes, M. Major, Revista Medicală (Tîrgu-Mureș); **5**, 447 (1959).
2. M. Kerekes, A. Kovács, Vth FEBS-Meeting, Prague 1968, Abstracts, p. 73.
3. T. I. Pristoupil, Nature, **212**, 75 (1966).
4. T. I. Pristoupil, M. Kramlová, J. Chromatogr., **48**, 90 (1970).
5. T. I. Pristoupil, Chromatogr. Rev., **12**, 109 (1970).
6. W. Heinzel, A. Vogt, E. Kallee, W. Feller, J. Lab. Clin. Med., **66**, 334 (1965).
7. I. M. Hais, K. Macek, Handbuch der Papierchromatographie, VEB G. Fischer Verlag Jena, 1963, Bd. 1, p. 58.
8. K. Simon, Med. Monatsschr., **11**, 662 (1957).

ST. CERC. BIOCHIM., 17, 2, 185–193 (1974)

MODIFICĂRI RESPIRATORII ŞI GLICOLITICE ÎN MIOCARDUL ŞOBOLANILOR CU UN SUPLIMENT DE GĂLBENUŞ DE OU LA REGIMUL DE CRESCĂTORIE ŞI SENSIBILIZAŢI ÎN PREALABIL CU VITAMINA D_2

GH. LEPORDA, CONSTANŢA HALLER, S. FREUND şi L. ABABEI

Rezumat. — Administrarea de doze mari de vitamină D_2 cît şi adausul cronic de gălbenuş de ou la regimul de crescătorie au produs perturbări în metabolismul respirator şi glicolitic al miocardului de şobolan Wistar. Adiţionînd cronic regimului de crescătorie un supliment de gălbenuş de ou sau de vitamină D_2 sau de gălbenuş de ou şi vitamină D_2, se favorizează modificarea mediului intern al celulei miocardice.

Administrarea cu gălbenuş de ou poate fi considerată şi ca un tratament cu doze mari de biotină şi indică relaţii strînse între efectul biochimic şi cel al vitaminei D_2.

Datele recente din literatură referitoare la concordanţa dintre tabloul umoral şi dinamica leziunilor cardiovasculare în ateromatoza umană sau experimentală sînt încă destul de contradictorii. Astfel, în timp ce unii autori (5) n-au găsit modificări umorale semnificative la şobolani după administrarea de regimuri bogate în grăsimi animale, alţii (6, 8, 14, 21) din contra susţin că după administrarea de gălbenuş de ou sau vitamina D_2 are loc o creştere promptă şi semnificativă a colesterolemiei şi lactacidemiei. În sfîrşit, după o a treia categorie de autori (3, 4, 9, 17), regimurile bogate în grăsimi animale sau colesterol, chiar dacă modifică tabloul umoral, n-ar putea determina modificări morfologice ale peretelui vascular, dacă acesta n-ar fi lezat în prealabil. Scerbat şi colab. (17), administrînd diete îmbogăţite în colesterol, au obţinut, după tratarea prealabilă a şobolanilor cu ser antiaortic, leziuni micro- şi macroscopice ale peretelui arterial şi modificarea semnificativă a tabloului umoral, concordanţă anatomoumorală ce n-au putut-o obţine numai cu imunoser sau numai cu regim hiperlipemiant.

Constantinides (3) a demonstrat prin studii de microscopie electronică că particolele de gălbenuş de ou injectate intravenos pot pătrunde în peretele arterial numai la animalele tratate în prealabil cu ergocalciferol. Fenomenul nu a putut fi pus în evidenţă la animalele normale sau la cele aflate în perioada de vindecare a leziunilor produse cu calciferol.

Dolinescu şi colab. (7) administrînd la animalele cu regim de crescătorie gălbenuş de ou pe fondul unor leziuni vasculare induse de hipervitaminoză D_2, au obţinut o agravare notabilă a acestor leziuni.

În aceeaşi ordine de idei, Krebs (10) spunea încă în 1939 că muşchiul striat scheletic şi muşchiul cardiac prezintă mari variaţii în consumul de oxigen, în raport de starea lor funcţională, fără ca acestea să fie un efect a unor hormoni (16) deoarece se manifestă şi în suspensiile de ţesut muscular în vitro. Cercetări recente de histo şi biochimie au demonstrat că enzimele implicate direct în procesele energetice din cord, vase sau altor organe scad la subiecţii cu ateromatoză (11, 12) sau suferă modificări ce variază cu gradul de afectare al vaselor sau cu posibilităţile de compensare (5).

Pe un asemenea model, adică la şobolan cu regim alimentar de crescătorie, sensibilizaţi în prealabil cu vitamina D_2 şi suplimentaţi zilnic cu o cantitate de gălbenuş de ou, am urmărit modificările respiratorii şi glicolitice din muşchiul cardiac.

MATERIAL ŞI METODĂ

Experimentul a durat 10 luni, de la începutul lunii februarie şi pînă la sfîrşitul lunii octombrie. Studiul s-a făcut pe şobolani Wistar de sex masculin, în greutate de 80—120 g, împărţiţi în 6 loturi experimentale.

— *Lotul 1 martor*, compus din 20 animale, a primit următorul regim alimentar considerat ca regim de crescătorie exprimat în g/animal/zi: pîine — 15 g, lapte — 15 g, ovăz — 15 g, morcov — 5 g, seminţe fl. soarelui — 1 g, făină de oase — 0,5 g, sare de bucătărie — 0,1 g; în zilele de iarnă (februarie, martie, aprilie) animalele au mai primit în plus ovăz încolţit — 1,45 g.

— *Lotul 2* compus din 20 animale care au primit regimul de crescătorie de mai sus şi în plus, zilnic, pe toată durata experimentului cîte 2 g gălbenuş de ou uscat la temperatura camerei.

— *Lotul 3* compus din 20 animale care au primit o asociaţie de regim de crescătorie şi gălbenuş de ou şi în plus, zilnic, timp de 12 zile la începutul experimentului, vitamina D_2 600.000 U.I./kg corp.

— *Lotul 4* compus din 20 de animale care au primit la regimul alimentar de crescătorie, zilnic, timp de 12 zile la începutul experimentului, vitamina D_2, 600.000 U.I./kg corp.

— *Lotul 5* compus din 20 de animale care au primit asociaţia regim de crescătorie şi gălbenuş de ou, iar în plus, la 2 zile interval, timp de 12 zile la începutul experimentului, vitamina D_2 600.000 U.I./kg corp.

— *Lotul 6* compus din 20 de animale care au primit regimul alimentar de crescătorie, iar în plus, la 2 zile interval, timp de 12 zile la începutul experimentului, vitamina D_2 600.000 U.I./kg corp.

Sacrificarea animalelor s-a făcut prin decapitare, iar din cordul prelevat imediat, s-a preparat la rece, în aparat Poter, la 6000 rot/min., un omogenat în zaharoză 0,25 M, proporţia 1/10 în care s-a determinat ulterior consumul de oxigen şi formarea de lactat.

Consumul de O_2 s-a determinat după metoda manometrică Warburg : mediu de incubație Smith (19); ca substrate: glucoză și succinat de Na în concentrație finală de 2×10^{-2} M; țesut cardiac — 25 mg; volum total — 2,2 ml (în vasul central 0,2 NaOH, soluție 10%); încălzirea — 5′ deschis și 5′ închis; incubația — 30′ la 37°C; agitare — 120 pendulări/minut; exprimarea consumului de O_2 — în mmc O_2/g țesut cardiac umed/h.

Determinarea formării de lactat s-a făcut după metoda Barker și Summerson (1) și s-a exprimat în μMol lactat/g țesut umed/h.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Din tabela 1 se observă că în omogenatul de miocard de la animalele care pe lîngă regimul de creșcătorie au primit gălbenuș de ou (lotul 2) sau vitamină D_2 (loturile 4 și 6) sau atît vitamina D_2 cît și gălbenuș de ou (loturile 3 și 5) are loc o acumulare de acid lactic care ar putea traduce o deviere a potențialului oxidoreductor celular spre o acidifiere a mediului intracelular cu consecință și în dezechilibrul piridin-nucleotidic dependent de echilibrul lactat/piruvat (2). Acumularea de lactat în aceste condiții ne face să emitem ipoteza unei deplasări a echilibrului NAD/NADH și NADP/$NADPH_2$. De altfel, suplimentul de gălbenuș de ou ar putea fi considerat și ca un tratament intensiv cu biotină (20). Aceasta ar putea condiționa, credem, o stimulare a proceselor de carboxilare, implicate în mod deosebit în sinteza de acizi grași și substanțe lipidice.

Din tabela 2 se vede că chiar în condiții de substrat endogen, în omogenatul de miocard de la animalele ce au primit vitamină D_2 în doze mari (lotul 4) sau vitamina D_2 în doze mari și gălbenuș de ou (lotul 3) are loc o creștere a consumului de O_2 în timp ce în omogenatul de la animalele ce au primit vitamina D_2 în doze mici (lotul 6) sau vitamina D_2 în doze mici și gălbenuș de ou (lotul 5) acest consum scade. Este probabil că la doze mici de vitamina D_2 sau la asocații de vitamina D_2 în doze mici și gălbenuș de ou să asistăm la o îngreuiere a transportului substanțelor necesare proceselor respiratorii celulare, prin membrana mitocondrială.

În privința dozelor mari de vit. D_2 este unanim acceptat efectul decuplant al acestei vitamine asupra proceselor de P/O (18).

Din tabela 3 se vede că în aceleași condiții de substrat endogen ca și în tabela 1, dar după 30′ de incubare la 37°C, are loc o creștere a formării de lactat, în omogenatul de miocard de la animalele cu gălbenuș de ou și vitamina D_2 în doze mari (lotul 3), ceea ce indică un efort de compensare a deficitului energetic respirator datorită decuplării P/O prin glicoliza crescută. Este de presupus că la concentrațiile mari de vit. D_2, în condițiile decuplării oxidative (18) deci în exces de ADP (acid adenozindifosforic) și P-anorganic, metabolismul glicolitic este avantajat. În acest sens vitamina D_2 poate fi considerată ca un factor esențial în controlul efectului Crabtree. Interesant ar fi aici de studiat paralelismul între hipervitaminoza D_2 și etiopatogenia bolii canceroase unde deasemeni efectul Crabtree este caracteristic. Iacassagni (13) atrăgea atenția în 1966 asupra activității sarcomatoase a 7-dehidrocolesterolului, precursor al vit. D_2.

Tabela 1

Concentrația staționară de lactat în omogenatul de miocard. Exprimarea în μMol/g/h.

Lot nr.	Lot nr.	2		3		4		5		6	
	Media în μMol/g/h	158		180		144		102		120	
		Δ	*p*	Δ	*p*	Δ	*p*	Δ	*p*	Δ	*p*
1	35	+123	<0,001	+145	<0,001	+109	<0,001	+67	<0,001	+85	<0,01
2	158			+ 22	>0,05(n)	−14	>0,05(n)	−56	<0,001	−38	>0,05(n)
3	180					− 36	>0,05(n)	−78	<0,01	−60	>0,05(n)
4	144							−42	<0,01	−24	>0,05(n)
5	102									+18	>0,05(n)

NOTA:

0.05 (n) statistic nesemnificativă
0.05 "semnificativă
0.01 "foarte semnificativă
0.001 "extrem de semnificativă (se apropie de semnificație absolută).

Tabela 2

Consumul endogen de O_2 în omogenatul de miocard incubat timp de 30′ la 37°C. Exprimarea mme O_2/g/h

Lot nr.	Lot nr.	2		3		4		5		6	
	Media în mmc_2O/g/h	1721		2724		2583		1333		1245	
		Δ	*p*	Δ	*p*	Δ	*p*	Δ	*p*	Δ	*p*
1	1866	−145	>0,05(n)	+ 858	<0,001	+723	>0,05(n)	− 533	<0,001	− 621	<0,01
2	1721			+1003	<0,001	+868	<0,05	− 388	<0,01	− 476	>0,05(n)
3	2724					−135	>0,05(n)	−1391	<0,001	−1479	<0,001
4	2583							−1256	<0,001	−1344	<0,01
5	1333									− 88	>0,05(n)

În aceeași ordine de idei Spisni (20), într-o sinteză a literaturii în legătură cu procesele de cancerizare și cu eventualele interrelații ale acestora cu vit. D_2, arăta în 1968 că poate fi discutată o influență favorabilă a vit. D_2 asupra procesului de malignizare.

Din tabela 4 se vede că în prezența succinatului, în omogenatul de miocard de la animalele suplimentate cu gălbenuș de ou, (lotul 2) are loc o creștere a consumului de oxigen. În omogenatul din același organ de la animalele care au primit vit. D_2 în doze mari (lotul 4) sau în doze mici (lotul 6), are loc deasemeni în prezența succinatului o stimulare a consumului de oxigen, stimulare care în ambele cazuri poate fi pusă pe seama efectului decuplant al vit. D_2 asupra P/O. Am văzut deja că în condițiile de substrat endogen (tabela 2) asocierea de gălbenuș de ou la hipervitaminoza D_2, datorită probabil efectului decuplant, nu modifică consumul crescut de O_2. Faptul că în prezența succinatului gălbenușul de ou reduce consumul de oxigen crescut în hipervitaminoza D_2, ar putea fi pus pe seama următorului factor: saturarea cu substrat (succinat) a enzimelor respiratorii poate favoriza formarea unui surplus de energie sub formă de ATP, care să favorizeze o hiperfuncție a carboxilazelor biotinice stimulate de gălbenușul de ou, cu consecințe în sinteza de acizi grași și lipide din membrana mitocondrială care ar putea modifica apoi transferul de vit. D_2 prin aceste membrane, și, deci ar diminua sau ar îndepărta total efectul decuplant al vit. D_2 asupra proceselor de fosforilare oxidativă.

Din tabela 5 se vede că tratamentul cu vit. D_2 în doze mari (lotul 4) induce, în condițiile incubării omogenatului timp de 30′ la 37°C, o creștere a capacității glicolitice a celulei miocardice, cînd se folosește ca substrat glucoza.

În tabela 6 se observă, în primul rînd, că în toate sistemele folosite de noi glucoza inhibă consumul de oxigen și, deci, potenționează efectul Crabtree. Interesant este faptul că glucoza exogenă are o acțiune mult mai inhibitoare asupra consumului de oxigen decît sistemul glicogen-glucoză endogen (tabela 2), care livrează o concentrație de substrat (glucoză) destul de mare pentru a fi comparabilă cu efectul glucozei exogene. Este posibil ca în aceste perturbări să fie implicat consumul de energie solicitat de transportul glucozei. Efectul decuplant al vit. D_2 se vede și din această tabelă (lotul 5).

CONCLUZII

1. Atît administrarea, chiar de scurtă durată, a unor doze mari de vitamina D_2, cît și adausul cronic de gălbenuș de ou la regimul de creșcătorie, par să fie factori nocivi pentru activitatea miocardului, prin perturbări respiratorii și glicolitice.

2. Aceste perturbări ar putea fi cauza incapacității unui cord de a se adapta la eforturi de lungă durată.

3. Adiționînd cronic regimului de creșcătorie un supliment de gălbenuș de ou sau de vitamină D_2 sau de gălbenuș de ou și de vitamină D_2, se favorizează modificarea mediului intern al celulei miocardice.

Tabela 3

Dozarea concentrației de lactat endogen în omogenatul de miocard incubat timp de 30′ la 37°C Exprimarea în μMol/g/h.

Lot. nr.	Lot nr.	2		3		4		5		6	
	Media în μMol/g/h	105,32		102,66		89,75		79,21		39,41	
		Δ	*p*	Δ	*p*	Δ	*p*	Δ	*p*	Δ	*p*
1	12,18	+93,14	—	+90,48	<0,001	+77,57	<0,001	+67,03	<0,001	+27,23	<0,01
2	105,32			−2,66	>0,05(n)	−15,57	>0,05(n)	−26,11	>0,05(n)	−65,91	<0,001
3	108,66					−12,91	>0,05(n)	−23,45	>0,05(n)	−63,25	<0,001
4	89,75							−10,54	>0,05(n)	−50,71	>0,05(n)
5	79,21									−39,80	<0,01

Tabela 4

Consumul de O_2 în omogenatul de miocard în prezența succinatului de Na în concentrația finală de $2 \cdot 10^{-2}$ M. Exprimarea în mmcO_2/g/h

Lot. nr.	Lot nr.	2		3		4		5		6	
	Media în mmcO_2/g/h	10261		4085		10374		6739		12843	
		Δ	*p*	Δ	*p*	Δ	*p*	Δ	*p*	Δ	*p*
1	8644	+1617	>0,05(n)	−4559	<0,01	+1730	>0,05(n)	−1905	<0,05	+4199	<0,001
2	10261			−6176	<0,001	+ 113	>0,05(n)	−3522	<0,05	+2582	<0,05
3	4085					+6289	<0,001	+2654	<0,05	+8758	<0,001
4	10374							−3635	<0,05	+2469	<0,05
5	6739									+6104	<0,001

Tabela 5

Dozarea de lactat în omogenatul de miocard incubat timp de 30′ la 37°C în prezența glucozei în concentrația finală de $2 \cdot 10^{-2}$ M. Exprimarea în μMol/g/h.

Lot nr.	Lot nr.	2		3		4		5		6	
	Media în μMol/g/h.	64		64		127		36		39	
		Δ	P	Δ	P	Δ	P	Δ	P	Δ	P
1	12	+52	<0,001	+52	<0,001	+115	<0,001	+24	<0,001	+27	<0,001
2	64			0	–	+ 63	<0,001	−28	<0,001	−25	<0,001
3	64					+ 63	<0,001	−29	<0,001	−25	<0,01
4	127							+63	<0,001	−88	<0,001
5	36									− 3	>0,05(n)

Tabela 6

Consumul de O_2 în omogenatul de miocard incubat timp de 30′ la 37°C în prezența glucozei în concentrație finală de $2 \cdot 10^{-2}$ M. Exprimarea în mmcO_2/g/h.

Lot nr.	Lot nr.	2		3		4		5		6	
	Media în mmco_2/g/h	1002		2012		1335		913		1001	
		Δ	P	Δ	P	Δ	P	Δ	P	Δ	P
1	1315	−313	<0,001	+697	<0,001	+20	>0,05(n)	−402	<0,001	−294	<0,001
2	1002			+1010	<0,01	+333	<0,001	− 89	>0,05(n)	+ 19	>0,05(n)
3	2012					−677	<0,001	−1099	<0,001	−991	<0,001
4	1335							−422	<0,001	−314	<0,01
5	913									+108	>0,05(n)

4. Administrarea de gălbenuş de ou, poate fi considerată şi ca un tratament cu doze mari de biotină şi indică relaţii strînse între efectul biotinic şi cel al vitaminei D_2.

Prezentat la redacţie
la 16 mai 1972

Institutul de sănătate publică
şi cercetări medicale
Iaşi

RESPIRATORY AND GLYCOLYTIC CHANGES IN MYOCARDIUM OF RATS FED ON A FARM DIET SUPPLEMENTED WITH EGG YOLK AND PREVIOUSLY SENSITIZED WITH D_2 VITAMIN

SUMMARY

The administration of high doses of D_2 vitamin as well as the addition of egg yolk to a farm diet induced some disturbances in respiratory and glycolytic metabolism of Wistar rat myocardium. The chronical addition of egg yolk and D_2 vitamin either alone or together, favours the modification of the internal medium of myocardial cell.

Egg yolk administration could be also regarded as a treatment with high doses of biotin; it also shows close relationships between the biochemical effect and that of D_2 vitamin.

BIBLIOGRAFIE

1. Barker S. B., Summerson W. H., J. Biol. Chem., **138**, 353 (1941).
2. Bücher Th., Klingenberg M., Angewante Chem., **70**, 552 (1958).
3. Constantinides P., Arch. Pathol., **85**, 280 (1968).
4. De Brux J., Calvarin R., Kaufman H., Presse Med., **72**, 1539 (1964).
5. De Gennes L., Laudat M. H., Carlotti J., Moukther M. S., Baillet J., Presse Méd., **33**, 1283 (1960).
6. Depalma R. G., Hubay C. A., Insull W., Robinson A. V., Hartman P. M., Surg. Gynecol. Obstr. (U.S.A.), **131**, 633 (1970).
7. Dolinescu Sofia, Chera Gh., Mihăilă Maria, Niţulescu I., St. cerc. embriol. citol., Seria citologie, **VII**, 9 (1970).
8. Gonţea I., Medicină Internă, **11**, 1051 (1964).
9. Hass G. M., Trucherat E., Hemmens A., Am. J. Path., **37**, 521 (1960).
10. Krebs H., Ciba Found. Symp. on the Regulation of Cell Metabolism, Edit. Churchill, Londra, 1939, p. 1.
11. Kuske V. H., Kulnev B. A., Chevaskaia A., Ciba Found. Symp. on the Regulation of Cell Metabolism, Edit. Churchil, Londra, 1959, p. 108.
12. Kutinger G. M., Wexler B. C., Miller B. F., Thèses du IV Congr. Intern. d'Angéologie, Praha, septembrie 1961, p. 107.
13. Lacassagne A., Nature, **209**, 1026 (1966).
14. Loiodice G., Ventor R., Moscatelli R., Minerva Pediatrica, **17**, 326 (1965).
15. Manta I., Bedeleanu D., Bîrzu O., St. cerc. biochim., **7**, 9 (1964).

16. Moga A., Hărăguș S., Văgăunescu Gh., Vlaicu R., *Probleme de actualitate în medicină*, Ed. Medicală, București, 1961, p. 130.
17. Scerbet I., Sensis J., Groult L., Iris J., Lenegre J., Arch. Mal. Coeur Vaisseaux, supl., **1**, 242 (1967).
18. Scipițina L. R., Biull. Ekxp. Biol. Med., **LXII**, 60 (1966).
19. Smith R. M., Osborne White M. S., Russel C. H., Biochem. J., 95, 411, 1965; Biochem. J., **104**, 441 (1967).
20. Spisni D., *Tumore e vitamini, aminoacidi macro e microelemente essenziali*, Ed. Dino Spisni, Pisa, 1966, p. 46.
21. Valls A. M., Bbonte-Stewart B., Brit. Med. J., **1**, 577 (1963).

ST. CERC. BIOCHIM., 17, 2, 195–203 (1974)

EFECTUL DEZECHILIBRULUI AMINOACIDIC DIN RAȚIA ALIMENTARĂ ASUPRA UNOR ENZIME HEPATICE

AURORA POPESCU, MARILENA FĂRCAȘIU, LIZICA CROITORESCU

Rezumat. — S-au determinat, la șobolan, activitățile a 8 enzime hepatice în trei tipuri (I, II, III) de dezechilibru aminoacidic.

Tipul I de dezechilibru (4 experiențe) s-a provocat prin adaus de 12% gelatină la o rație de bază cuprinzînd 8% cazeină. Dezechilibrul de tipul II (4 experiențe) s-a determinat prin adaus de 0,6% metionină + 0,9% fenilalanină la o rație de bază cuprinzînd 6% fibrină. Dezechilibrul de tipul III (5 experiențe) s-a provocat prin adaus de 0,36% treonină la o rație de bază cu 8% cazeină.

Activitatea D-aminoacid-oxidazică a fost influențată numai de dezechilibrul de tipul I, fiind mai mică la animalele dezechilibrate. Activitățile xantin-oxidazică și succinat-dehidrogenazică au crescut în dezechilibrul de tipul II și nu au fost afectate de celelalte tipuri de dezechilibru. Activitățile aldolazei, lactat-dehidrogenazei și fosfatazei alcaline au fost influențate de dezechilibrele de tipul I și de tipul III, fiind mult mai scăzute la șobolanii dezechilibrați. Activitatea fosfatazei acide a scăzut în toate tipurile de dezechilibru.

Cele mai multe dintre numeroasele cercetări cu privire la dezechilibrul aminoacidic din rația alimentară, publicate în anii din urmă, au privit în special natura raților care provoacă dezechilibrul (1, 2, 3). Ele au condus la o conturare neechivocă a acestui fenomen (3, 4). Însă înțelegerea tulburărilor de ordin metabolic care determină aspectele imediate ale dezechilibrului n-a progresat în aceeași măsură.

Deoarece întîrzierea creșterii — efectul principal al hrănirii cu rație dezechilibrată — pare să fie datorită consumului redus de alimente (3), mult mai mic decît la animalele hrănite cu rație de bază, diverși cercetători au căutat să explice cauzele inapetenței pentru rația dezechilibrată (5, 6). Cei mai mulți au pus inapetența în legătură cu un „tablou" anormal al concentrației aminoacizilor din plasmă, aflat la animalele hrănite cu rație dezechilibrată (7, 8, 9, 10). Ei au sugerat, în esență, că: (*a*) abundența aminoacizilor dezechilibranți ar stimula sinteza unor anume proteine, în dauna altora; (*b*) această disproporție a sintezei proteinelor ar determina „tabloul" anormal al aminoacizilor plasmatici; (*c*) modificarea „tabloului" aminoacizilor ar antrena inapetența.

Presupunerea că aminoacizii dezechilibranți influențează printr-un efect de masă sinteza proteinelor nu se sprijină pe date experimentale categorice. În general, obținerea unor asemenea date pare destul de grea,

însă studiul comparativ al activităților enzimatice, la animale hrănite cu rații dezechilibrate și la animale martor, ar putea conduce la constatări utile pentru discutarea acestei ipoteze. Se știe, de altfel, că modificările calitative și cantitative ale rației azotate determină variații ale activității unor enzime (11, 12, 13, 14, 15) și este, desigur, interesant să se cunoască dacă și în ce mod activitățile enzimatice sînt influențate de hrănirea cu rații dezechilibrate.

În lucrarea de față s-a studiat, la șobolani, influența a trei tipuri de dezechilibru (I, II, III) asupra unui grup de 8 enzime hepatice. Dezechilibrul de tipul I a fost provocat prin adăugire de gelatină la o rație de bază cuprinzînd drept aliment azotat numai cazeină; dezechilibrul de tipul II s-a provocat prin adăugire de metionină și fenilalanină la o rație de bază cuprinzînd drept singură proteină fibrina, iar dezechilibrul de tipul III s-a determinat prin adăugirea treoninei la o rație de bază cuprinzînd drept unic aliment azotat cazeina. Enzimele hepatice studiate au fost: uricaza, D-aminoacidroxidaza, xantin-oxidaza, succinat-dehidrogenaza, aldolaza, lactat-dehidrogenaza, fosfataza acidă și fosfataza alcalină.

MATERIAL ȘI METODE

S-au efectuat 13 experiențe pe șobolani în vîrstă de 23—27 zile. Animalele au fost cîntărite, ținute în cuști individuale și hrănite *ad libitum*, timp de 4—5 zile, cu rația de bază.

S-au folosit trei rații de bază: *rația 1*, *rația 2* și *rația 3*. Ele au fost administrate astfel: *rația 1* șobolanilor din experiențele 1—4 privind dezechilibrul de tipul I; *rația 2* șobolanilor din experiențele 5—8 privind dezechilibrul de tipul II; și *rația 3* celor din experiențele 9—13 corespunzătoare dezechilibrului de tipul III. Compozițiile procentuale ale rațiilor de bază sînt date mai departe.

La începutul și la sfîrșitul intervalului de 4—5 zile s-au cîntărit toate animalele și s-au păstrat pentru experiențele propriu-zise numai cele care au crescut în greutate, dovedind astfel acomodare la hrănirea cu rația de bază. Apoi, pentru fiecare experiență, animalele au fost grupate cîte 6 în 2 loturi: *lotul martor* și *lotul experimental*. Gruparea s-a făcut astfel încît fiecărui șobolan din lotul experimental să-i corespundă în lotul martor cîte un șobolan de același sex, provenit din aceeași femelă și avînd aproximativ aceeași greutate. În fiecare experiență, animalele din lotul martor au fost hrănite *ad libitum* cu rația de bază folosită în perioada de acomodare, timp de 2 săptămîni în experiențele 1—4 și timp de 3 săptămîni în celelalte experiențe. Șobolanii din loturile experimentale au fost hrăniți *ad libitum* cu o rație dezechilibrată în aminoacizi și corespunzînd rației de bază cu care erau hrănite animalele din loturile martor. Astfel, șobolanii loturilor experimentale din experiențele 1—4 au fost hrăniți cu *rația 1'*, cei din experiențele 5—8 cu *rația 2'*, iar cei din experiențele 9—13 au primit *rația 3'*. Compozițiile rațiilor dezechilibrate (*1'*, *2'* și *3'*) sînt date și ele mai departe.

În cursul perioadelor experimentale s-a consemnat zilnic consumul de hrană al fiecărui animal iar toți șobolanii au fost cîntăriți regulat, la interval de 3—4 zile, întocmindu-se curbele de creștere. La sfîrșitul celor

două, respectiv trei săptămîni de experienţă, şobolanii au fost sacrificaţi şi la fiecare s-a prelevat ficatul. Acesta s-a cîntărit şi s-a omogenizat, iar în omogenat s-a determinat activitatea unora din cele 8 enzime hepatice.

Activitatea uricazică s-a determinat prin metoda manometrică descrisă de Muramatsu şi Ashida (16), cu singura excepţie că omogenatul de ficat a fost de două ori mai diluat decît cel folosit în metoda descrisă de aceşti autori. *Activitatea xantin-oxidazică* s-a determinat printr-o metodă manometrică descrisă de aceiaşi autori (17). S-a folosit însă omogenat de ficat de aceeaşi concentraţie ca cea utilizată pentru determinările de uricază. *Activitatea D-aminoacid-oxidazică* s-a determinat conform metodei manometrice descrise de Muramatsu şi Ashida (16). *Activitatea succinat-dehidrogenazică* s-a determinat prin metoda descrisă de Muramatsu şi Ashida (17), cu excepţia că determinările s-au făcut pe volume de omogenat de două ori mai mici decît cele folosite în metoda descrisă de aceşti autori. *Activitatea aldolazică* s-a determinat prin metoda descrisă de Bruns (18), adaptată la determinări de aldolază în omogenat de ficat. *Activitatea lactat-dehidrogenazică* s-a determinat conform metodei descrise de Weber (19), cu excepţia că soluţia de $NADH_2$ folosită la dozări a fost de 10 ori mai concentrată decît cea recomandată de autor. *Activitatea fosfatazei acide* s-a determinat prin metoda descrisă de Franklin (20), iar *activitatea fosfatazei alcaline* prin metoda dată de Rosenthal (21).

Activităţile enzimatice au fost raportate la greutatea totală a ficatului şi s-au exprimat după cum urmează: pentru *xantin-oxidază* şi *D-aminoacid-oxidază* în ml O_2/oră; pentru *uricază* în ml O_2/20 minute, pentru *succinat-dehidrogenază* în mg formazan/oră; pentru *aldolază* în mM fructozo-1,6-difosfat/oră, pentru *lactat-dehidrogenază* în mM piruvat/oră şi pentru *fosfataze* în μM acid fosforic/oră.

Compoziţiile procentuale ale raţiilor

Raţia 1, zaharoză 81,55, caseină 8; ulei de germene de porumb 5; amestec salin 5; DL-metionină 0,3; clorhidrat de colină 0,15; amestec de vitamine pentru 100 g raţie.

Raţia 1': aceeaşi compoziţie ca *raţia 1*, cu excepţia că cuprindea 12 g gelatină, adăugate pe seama zaharozei.

Raţia 2: amidon 83,85; fibrină 6; amestec salin 5; ulei de germene de porumb 5; colină 0,15; şi amestec de vitamine suplimentat cu 2,5 mg acid nicotinic pentru 100 g raţie.

Raţia 2': aceeaşi compoziţie ca *raţia 2*, cu diferenţa că cuprindea un adaos constituit din 0,6 DL-metionină şi 0,9 DL-fenilalanină. Aceşti doi aminoacizi au fost adăugaţi pe seama amidonului.

Raţia 3: aceeaşi compoziţie ca *raţia 1* (cu diferenţa că cuprindea caseină Hammarsten-Merck).

Raţia 3': aceeaşi compoziţie ca *raţia 3*, cu diferenţa că cuprindea un surplus de 0,36 DL-treonină, adăugat pe seama zaharozei.

Compoziţia amestecului salin

$CaCO_3$ 29,29; $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$ 0,43; KH_2PO_4 34,31; NaCl 25,06; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 9,98; $Fe(C_6H_5O_7) \cdot 6H_2O_4$ 0.623; $CuSO \cdot 5H_2O$ 0,156; $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0,121; $ZnCl_2$ 0,02; KI 0,005; $(NH_4)_2$ MoO_4 0,0025 pentru 100 g amestec.

Compoziția amestecului de vitamine

Clorhidrat de tiamină 0,37 mg, riboflavină 0,5 mg, pantotenat de Ca 2 mg, clorhidrat de piridoxină 0,25 mg, biotină 0,01 mg, acid folic 0,02 mg, vitamina B_{12} 0,02 mg, inozitol 10 mg, acid ascorbic 5 mg, vitamina K (menadiona) 0,05 mg, α — tocoferol 10 mg, vitamina A 400 U.I. și vitamina D_2 200 U.I. pentru 100 g rație.

REZULTATE

Rezultatele celor 13 experiențe sînt cuprinse în tabelele 1 și 2.

În tabela 1 sînt trecute, pentru fiecare lot experimental și martor, consumul mediu de rație din întreaga perioadă experimentală, raportat la greutatea medie a șobolanilor din lot*), precum și creșterea medie în greutate a animalelor. În tabela 2 sînt prezentate activitățile enzimatice la sfîrșitul experiențelor.

DISCUȚIE

Datele din tabela 1 permit să se aprecieze influența pe care au exercitat-o cele trei tipuri de dezechilibru asupra consumului rațiilor și, în special, asupra creșterii animalelor. În toate experiențele aparținînd celor trei tipuri de dezechilibru, șobolanii din loturile experimentale au consumat (pentru 1 g greutate-corp) mai puțină rație dezechilibrată decît rația de bază consumată de șobolanii din loturile martor corespunzătoare.

Pe de altă parte, datele din tabela 1 mai arată că în toate experiențele dezechilibrul aminoacizilor s-a manifestat prin întîrzieri importante de creștere la animalele din loturile experimentale. Într-adevăr, în experiențele 1—4 (dezechilibrul de tipul I) cîștigurile în greutate ale animalelor din loturile experimentale au fost cuprinse între cca 25% și 40% din cîștigurile animalelor din loturile martor corespunzătoare; în experiențele 5—8 (dezechilibrul de tipul II) cîștigurile în greutate la șobolanii din loturile experimentale au reprezentat numai 69—78% din cîștigurile șobolanilor martor, iar în experiențele 9—13 (dezechilibrul de tipul III) creșterile în greutate ale animalelor din loturile experimentale au fost cuprinse între 28% și 47% din cele ale animalelor martor.

Efectele dezechilibrului aminoacizilor asupra activităților celor 8 enzime hepatice reies din tabela 2.

În primul rînd, se constată că — în genere — dezechilibrul nutritiv al aminoacizilor influențează apreciabil activitățile enzimatice ale ficatului.

Pe de altă parte, se mai constată că — de obicei — o aceeași enzimă este influențată deosebit de fiecare din cele trei tipuri de dezechilibru.

*) Această greutate medie reprezintă semi-suma greutăților medii pe care lotul le-a avut la începutul și la sfîrșitul perioadei experimentale.

Tabela 1

Efectele diverselor tipuri de dezechilibru aminoacidic din raţie asupra consumului de hrană şi asupra creşterii în greutate a şobolanilor

Tipul de dezechilibru	Experienţa nr.	Lotul	Consum mediu de raţie/greutate medie	Cîştig mediu în greutate
			g/g	g/2 săpt.
Tipul I	1	experimental	1,51	5,50±5,28
		martor	1,76	20,2 ±4,74
	2	experimental	1,89	11,6 ±2,96
		martor	2,44	30,4 ±5,32
	3	experimental	1,44	6,05±5,62
		martor	1,86	25,5 ±9,80
	4	experimental	1,41	8,20±7,59
		martor	1,85	20,9 ±4,09
				g/3 săpt.
Tipul II	5	experimental	3,23	31,7±7,06
		martor	3,51	45,7±8,31
	6	experimental	2,76	24,2±5,08
		martor	2,92	32,1±6,40
	7	experimental	2,68	32,2±2,40
		martor	3,31	44,7±5,34
	8	experimental	2,96	39,0±4,05
		martor	3,24	49,8±6,65
				g/3 săpt.
Tipul III	9	experimental	2,54	18,3± 1,03
		martor	3,04	39,3±10,8
	10	experimental	2,37	15,1± 9,01
		martor	2,89	34,7± 6,25
	11	experimental	2,49	9,2± 4,07
		martor	3,15	29,8± 5,78
	12	experimental	2,43	17,0± 4,73
		martor	2,74	36,0± 5,61
	13	experimental	2,27	11,0± 7,45
		martor	2,77	39,2± 2,63

În al treilea rînd, se constată că un acelaşi tip de dezechilibru influenţează în mod diferit activitatea diverselor enzime studiate. Numai *uricaza* face excepţie ; activitatea ei n-a fost influenţată deloc, de nici unul din cele trei tipuri de dezechilibru.

Trecînd în revistă comportările celorlalte şapte enzime hepatice, reiese că :

Activitatea D-aminoacid-oxidazică a scăzut la animalele dezechilibrate în dezechilibrul de tipul I. Într-adevăr, în cele două experienţe ale dezechilibrului de tipul I în care s-a determinat activitatea acestei enzime, D-aminoacid-oxidaza aflată la loturile dezechilibrate a reprezentat 46% şi respectiv 60% din cea aflată la loturile martor corespunzătoare. Activitatea acestei enzime nu a fost influenţată de celelalte două tipuri de dezechilibru.

Activităţile xantin-oxidazică şi *succinat-dehidrogenazică* nu au fost influenţate de dezechilibrul de tipul I şi nici de cel de tipul III. În schimb, dezechilibrul de tipul II a determinat creşterea lor semnificativă. Astfel,

Tabela

Influența diverselor tipuri de dezechilibru aminoacidic

Tipul de dezechilibru	Experiența Nr.	Lotul	Uricaza ml O_2/20′	D-amino-acid oxidaza ml O_2/oră	Xantin-oxidaza ml O_2/oră
Tipul I	1	exp.	1,46±0,37	1,15±0,38 b)	1,41±0,43
		martor	1,50±0,21	2,50±0,49	0,98±0,29
	2	exp.	2,33±0,49	1,36±0,44 a)	1,88±0,40
		martor	1,86±0,46	2,28±0,72	1,83±0,38
	3	exp.	—	—	—
		martor	—	—	—
	4	exp.	—	—	—
		martor	—	—	—
Tipul II	5	exp.	—	—	—
		martor	—	—	—
	6	exp.	—	—	—
		martor	—	—	—
	7	exp.	1,62±0,31	2,53±0,81	1,71±0,62 a)
		martor	1,54±0,37	2,21±0,51	0,78±0,48
	8	exp.	1,85±0,49	2,92±1,40	3,16±1,33 b)
		martor	1,73±0,58	2,69±1,30	1,02±0,51
Tipul III	9	exp.	2,42±0,57	2,45±1,29	1,13±0,21
		martor	1,92±0,52	1,63±1,01	1,03±0,49
	10	exp.	—	—	—
		martor	—	—	—
	11	exp.	—	—	—
		martor	—	—	—
	12	exp.	—	—	—
		martor	—	—	—
	13	exp.	2,61±0,44	2,51±0,63	1,00±0,27
		martor	2,33±0,76	3,26±1,11	0,95±0,24

a) Siguranța statistică a diferențelor dintre valorile medii >95% ($p < 0,05$).

activitatea xantin-oxidazică a avut într-una din experiențele privind dezechilibrul de tipul II o valoare dublă la lotul dezechilibrat, față de lotul martor (cu 46% mai mare), iar în a doua experiență, de același tip, activitatea enzimei a fost de trei ori mai mare la lotul dezechilibrat decît la lotul martor. *Activitatea succinat-dehidrogenazei* a fost cu 56% mai mare la lotul dezechilibrat decît la lotul martor în ambele experiențe privind dezechilibrul de tipul II.

Activitățile aldolazei, lactat-dehidrogenazei și *fosfatazei alcaline* nu au fost influențate de dezechilibrul de tipul II, dar au scăzut semnificativ în dezechilibrul de tipul I și în cel de tipul III. Astfel, *activitatea*

din rație asupra activității unor enzime hepatice

Succinat dehidrogenaza mg form/oră	Aldolaza m MFDP/oră	Lactat-dehidrogenaza m M piruvat/ oră	Fosfataza acidă μ M P_i/oră	Fosfataza alcalină μ M P_i/oră
—	—	—	—	—
—	—	—	—	—
10,2 ±1,93	—	—	—	—
11,5 ±2,06	—	—	—	—
6,27±1,09	3,20±0,60 b)	44,7± 9,76 a)	586± 75,1 b)	103±35,1 b)
4,99±1,20	5,23±0,67	93,5±32,4	806±180	243±50,1
—	2,48±0,48 b)	40,7±10,7 b)	587± 82,5 b)	105±15,3 b)
—	4,37±0,44	107 ± 12,4	859±128	246±32,0
14,6 ±4,12 b)	3,89±1,06	101±34,0	—	139±36,2
8,18±2,07	3,81±1,16	108±50,2	—	203±92,3
9,12±1,90 b)	3,55±0,41	81,7±14,0	869±115 a)	—
5,08±1,69	3,67±0,39	91,4±22,5	1063± 57,9	—
—	—	—	1029±143 a)	156±30,0
—	—	—	1285±169	198±43,2
—	—	—	—	—
—	—	—	—	—
—	—	—	776± 15,1 a)	131±45,1 b)
—	—	—	1036±215	310±65,1
10,8 ±1,12	3,33±0,81 b)	66,8±26,0 a)	681± 98,4 b)	113± 34,2 b)
10,9 ±2,73	6,17±1,11	118 ±42,0	977±137	278±114
11,6±1,96	2,46±0,71 b)	35,6± 6,39 b)	616±69,7 a)	112±21,8 b)
11,7±1,81	5,08± 0,54	86,5±26,5	851±200	246±43,1
6,78±1,33	3,47±0,85 b)	61,0±9,51 b)	—	—
7,18±1,99	6,59±0,81	127 ±18,2	—	—
—	—	—	765± 83,8 b)	119±20,4 b)
—	—	—	1244±176	260±47,3

b) Siguranța statistică a diferențelor dintre valorile medii >99% ($p < 0,01$).

aldolazică medie aflată la lotul experimental în dezechilibrul de tipul I a reprezentat 61% din cea a lotului martor într-o experiență, respectiv 57% în altă experiență. În dezechilibrul de tipul III activitatea medie a enzimei la animalele dezechilibrate a fost de 54% din cea aflată la martori într-o experiență, de 48% și de 53% în celelalte experiențe. *Activitatea lactat-dehidrogenazică* aflată la animalele loturilor experimentale în cazul dezechilibrului de tipul I a reprezentat 48% și respectiv, 38% din activitatea aflată la loturile martor. În dezechilibrul de tipul III activitatea lactat-dehidrogenazică medie a loturilor experimentale a reprezentat, în prima experiență 57%, 41% în a doua experiență și în a treia

experiență 48% din valoarea medie aflată la loturile martor corespunzătoare. *Activitatea fosfatazei alcaline* aflată la animalele dezechilibrate în dezechilibrul de tipul I a fost — în ambele experiențe — de cca 42% din activitatea prezentată la loturile martor. În dezechilibrul de tipul III activitatea enzimei la animalele dezechilibrate a fost de cca 42% din cea prezentată de animalele martor într-o experiență, de 41% în altă experiență și de cca 46% în celelalte două experiențe.

Activitatea fosfatazei acide a fost influențată de toate cele trei tipuri de dezechilibru, fiind totdeauna mai mică la animalele dezechilibrate. Într-adevăr, activitatea medie a fosfatazei acide aflată la loturile experimentale a reprezentat din activitatea loturilor martor corespunzătoare: în dezechilibrul de tipul I 73% și 68%; în dezechilibrul de tipul II 82% și 80%, iar în dezechilibrul de tipul III 75%, 70%, 72% și 61%.

Din toate rezultatele celor 13 experiențe efectuate se desprinde clar faptul că „natura" dezechilibrului aminoacidic din rație joacă un rol important atît în a ceea ce privește influența lui asupra enzimelor (hepatice) cît și asupra creșterii animalelor. Într-adevăr, dezechilibrul de tipul I — provocat prin adaus de gelatină la rația cuprinzînd 8% cazeină — a influențat activitățile a 5 din cele 8 enzime hepatice studiate și, totodată, a influențat în cea mai mare măsură creșterea animalelor (25—40% din creșterea martorilor); dezechilibrul de tipul III — determinat prin adaus de treonină la rația cuprinzînd 8% cazeină — a influențat activitatea a 4 din cele 8 enzime hepatice și a determinat întîrzieri de creștere relativ mai reduse (28—47% din creșterea animalelor martor); iar dezechilibrul de tipul II — provocat prin adaus de metionină și fenilalanină la rația cu fibrină — a afectat activitățile numai a 3 enzime determinînd totodată, întîrzieri de creștere în și mai mică măsură (69—78% din creșterea animalelor martor).

CONCLUZII

În tipurile de dezechilibru studiate în lucrarea de față au loc modificări cantitative importante ale unora dintre activitățile enzimatice cercetate, modificări care — de altfel — nu sînt totdeauna scăderi. Se înțelege, în aceste condiții, că datele pe care le aducem pot fi considerate perfect compatibile cu presupunerea că aminoacizii dezechilibranți influențează sinteza proteinelor; cel puțin a proteinelor enzimatice.

Prezentat la redacție
la 25 ianuarie 1974

Facultatea de Medicină
Catedra de Chimie Biologică
I.M.F. București

THE EFFECT OF DIETARY AMINO ACID IMBALANCE ON SOME LIVER ENZYMES

SUMMARY

The activities of 8 rat liver enzymes were estimated in three types (I, II, III) of dietary amino acid imbalance.

The type I of imbalance (4 experiments) was induced by addition of 12% gelatin to a basal diet comprising 8% casein. Imbalance of type

II (4 experiments) was provoked by addition of 0,6 % methionine + 0,9 % phenylalanine to a basal diet containing 6 % fibrin. The type III of imbalance (5 experiments) was produced by addition of 0,36 % threonine to the basal diet with 8 % casein.

D-amino acid oxidase activity was influenced only by the imbalance of type I, being lower in the imbalanced animals. The xanthine oxidase and succinate dehydrogenase activities increased in type II of imbalance and were not affected by the other types of imbalance. The aldolase, lactate dehydrogenase and alkaline phosphatase activities were influenced by imbalances of types I and III, being much lower in the imbalanced rats. Acid phosphatase activity was lower in all three kinds of imbalance.

BIBLIOGRAFIE

1. A. E. Harper, Ann. N. Y. Acad. Sci., **69**, 1025 (1958).
2. W. D. Saimon, Am. J. Clin. Nutrition, **6**, 487 (1958).
3. A. E. Harper, în *Mammalian protein metabolism*, edit. H.N. MUNRO, J.B. ALLISON, **2**, 87, Acad. Press, New York (1964).
4. A. E. Harper, Q. R. Rogers, Proc. Nutr. Soc., **24**, 173 (1965).
5. J. C. Sanahuja, M. E. Rio, J. Nutrition, **91**, 407 (1967).
6. J. Swischer—Ellison, K. W. King, J. Nutrition, **94**, 543 (1968).
7. J. C. Sanahuja, M. E. Rio, J. Nutrition, **95**, 295 (1968).
8. D. R. Hartman, K. W. King, J. Nutrition, **92**, 455 (1967).
9. N. J. Benevenga, A. E. Harper, Q. R. Rogers, J. Nutrition, **95**, 434 (1968).
10. Y. Peng, J. K. Tews, A. E. Harper, Am. J. Physiol., **222** (2), 314 (1972).
11. C. Caroll, D. Arata, D. C. Cederquist, J. Nutrition, **70**, 502 (1960).
12. P. S. S. Dawson, Nature, **110**, 375 (1966).
13. C. H. Gallagher, *Nutritional factors and enzymological disturbances in animals*, ed.Crosby Lockwood et Son, London, 1964, p. 31.
14. R. D. Reynolds, V. R. Potter, H. Ritot, J. Nutrition, **101**, 797 (1971).
15. W. R. Featherston, R. A. Freedland, J. Nutrition, **103**, 625 (1973).
16. K. Muramatsu, K. Ashida, J. Nutrition, **76**, 143 (1962).
17. K. Muramatsu, K. Ashida, Agr. Biol. Chem., **25**, 702 (1961).
18. F. H. Bruns, H. U. Bergmeyer, în : *H.U. Bergmeyer, Methods of enzymatic analysis*, ed. Academic Press New York, 1963, p. 725.
19. G. Weber, J. Nutrition, **71**, 156 (1960).
20. T. J. Frankin, Biochem. J., **82**, 118 (1962).
21. O. Rosenthal, J. C. Fahl, H. M. Vars, J. biol. chem., **194**, 299 (1952).

ST. CERC. BIOCHIM., 17, 2, 205—208 (1974)

CONTRIBUȚII LA DOVEDIREA FORMĂRII AMINOACIZILOR ÎNAINTEA APARIȚIEI VIEȚII PE PĂMÎNT. OBȚINEREA UNOR AMINOACIZI DIN METAN, AMONIAC ȘI APĂ PRIN DESCĂRCĂRI ELECTRICE DE ÎNALTĂ FRECVENȚĂ

D. ȘTEFĂNESCU și A. CONSTANTINESCU

Rezumat. — Lucrarea este o contribuție la dovedirea formării unui număr de unsprezece aminoacizi din amestecul gazos de metan, amoniac și vapori de apă, corpuri existente preponderent în atmosfera reducătoare a planetelor fără viață, sub acțiunea descărcărilor electrice de înaltă frecvență cu electrozi exteriori. Se dă schema instalației în flux continuu și parametrii de descărcare folosiți. Prin cromatografie Mathias s-au identificat următorii aminoacizi: lizina, acidul glutamic, acidul aspartic, glicocolul, hidroxiprolina, alanina, serina, prolina, valina, fenilalanina, leucina-izoleucina și în cantități relativ mai mari în comparație cu aminoacizii obținuți prin descărcări electrice cu electrozi interiori. Cromatogramele indică constant formarea unor derivați ai alaninei, probabil peptide ale acesteia.

Primele rezultate privind sinteza aminoacizilor realizată în laborator prin descărcări electrice și care au condus la dovedirea formării lor din metan, hidrogen, amoniac și apă sînt datorate lui S. Miller și H. Urey [1—6].

Pornind de la datele actuale asupra compoziției atmosferei primare Miller, după cum se știe, a supus acțiunii descărcărilor electrice într-un aparat cu electrozi interiori un amestec de metan, amoniac, hidrogen și vapori de apă, obținînd numeroși compuși organici, între care și aminoacizi, dovedind pentru prima dată rolul descărcărilor electrice în formarea compușilor organici în era prebiotică a planetei noastre.

În cercetările noastre prezentate în această lucrare am utilizat descărcările electrice de înaltă frecvență care corespund mai bine ipotezei după care descărcările electrice atmosferice abundente ar fi provocat formarea de compuși organici în epoca prebiotică a Terrei.

Noi am ales un alt tip de descărcare electrică decît cea folosită de autorii sus menționați și anume descărcarea la înaltă frecvență cu electrozi exteriori datorită și faptului că descărcarea la înaltă frecvență cu electrozi exteriori mai are și avantajul eliminării aproape integrale a formării cărbunelui coloidal care apare prin fragmentarea moleculelor de hidrocarburi în ciocnirile cu electronii și se depune pe pereții tubului de descărcare în

cazul folosirii electrozilor interiori, ceea ce conduce la adsorbția unora dintre produșii obținuți și face foarte dificilă separarea, identificarea și estimarea proporțiilor acestora.

MATERIAL ȘI METODĂ

Instalația de descărcare electrică de înaltă frecvență folosită de noi este concepută astfel încît să asigure o descărcare controlată într-un flux continuu de amestec gazos, asemănător condițiilor în care metanul, amoniacul, hidrogenul și vaporii de apă se găseau în atmosfera primară a Terrei.

Figura 1 reprezintă schema instalației folosite.

Intrarea fiecărui gaz care ia parte la descărcare se face printr-un debitmetru (*1,2* etc.), pe una din căile cu care este prevăzută instalația pînă la tubul de descărcare electrică.

Tubul de descărcare *3*, din sticlă razoterm, are lungimea de 65 cm și diametrul interior de 6 cm. Manometrul cu mercur *4* măsoară presiunea medie a gazului în tub. Pentru urmărirea micilor variații de presiune este prevăzut manometrul cu ulei de silicon *5*.

Produșii de captare sînt captați în trapa *6*, care poate conține apă distilată la temperatura ambiantă.

Evacuarea aerului și circulația gazelor este asigurată de o pompă de vid.

Alimentarea electrozilor exteriori *7* se face printr-un oscilator *10*. Controlul tensiunii și curentului de descărcare se face cu ajutorul kilovoltmetrului *8*, respectiv al instrumentului *9*.

În lucrarea de față se expun rezultatele experiențelor efectuate la următorii parametri de descărcare:

— tensiunea la electrozi 4000 de volți, curentul de descărcare 200 mA, frecvența oscilatorului 1,5 MHz, presiunea parțială a gazului metan 10 torri, presiunea parțială a amoniacului 20 torri, debitul de gaz metan 8 litri pe oră și cel de amoniac 16 litri pe oră.

Înaintea introducerii amestecului de gaze, se face evacuarea aerului din interiorul instalației prin trecerea unui curent de amestec gazos cîtva timp prin tubulura instalației.

După ce s-a îndepărtat aerul și din interiorul trapei prin conectarea acesteia la tubulura instalației legată cu pompele de vid, vaporii de apă de la suprafața apei din trapă aflați la tensiunea de vapori corespunzătoare presiunii din interiorul instalației difuzează parțial în tubul de descărcare, întregind astfel compoziția amestecului supus descărcărilor.

Soluția apoasă din trapa de captare conține, după descărcarea electrică, compușii formați prin combinarea fragmentelor (radicali, atomi și molecule ionizate, electroni) rezultate din ciocnirile electronilor cu moleculele de metan, amoniac și apă (vapori).

Aceste soluții, obținute repetat, au fost supuse determinărilor cromatografice.

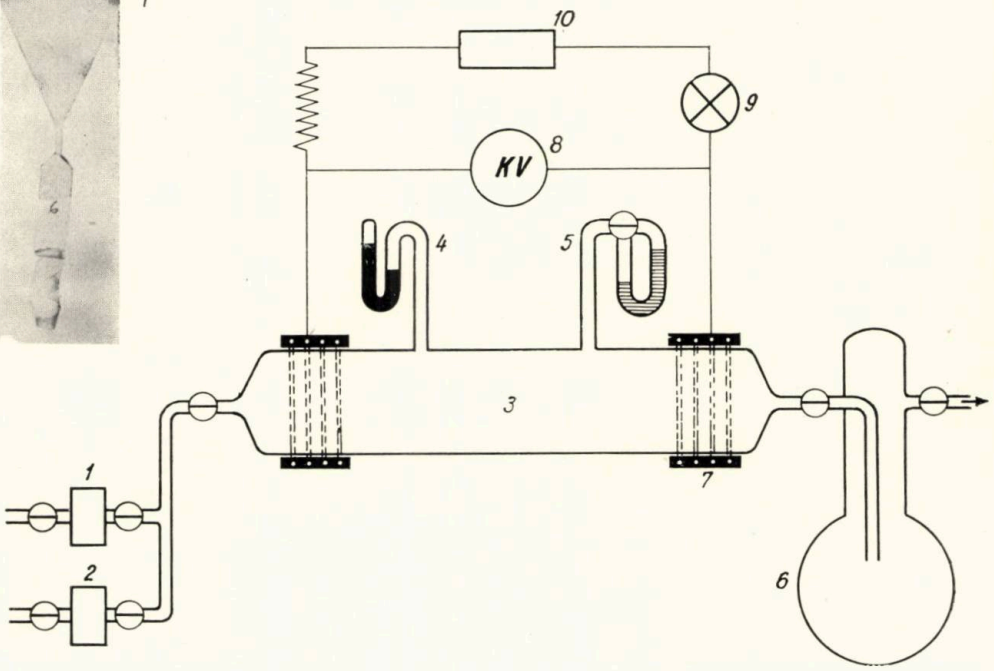
Pentru separarea aminoacizilor existenți în probele de analizat noi am folosit metoda cromatografiei de repartiție.

Fig. 2. Separări de aminoacizi prin cromatografie Mathias.

— lizina (*1*); — serina (*2*); — ac. aspartic (*3*); — ac. glutamic (*4*); — hidroxiprolina (*5*); — glicocolul (*6*); — alanina (*7*); — prolina (*8*); — valina (*9*); — fenilalanina (*10*); — leucina-izoleucina (*11*).

Fig. 1. Schema instalației de descărcare electrică cu electrozi exteriori

— debitmetre (*1,2*); — tub de descărcare (*3*); manometru cu mercur (*4*); — manometru cu ulei de silicon (*5*); — trapă de captare (*6*); — electrozi exteriori (*7*); kilovoltmetru (*8*); — instrument de măsură (*9*); — oscilator (*10*).



Inițial am aplicat tehnica ascendentă, optînd apoi pentru tehnica cromatografică Mathias, care și în cazul nostru, al separării amestecurilor de aminoacizi, s-a dovedit superioară altor tehnici cromatografice, realizînd o mai bună separare. Pe benzi de hîrtie cromatografică Schleicher — Schüll nr. 2040 a, avînd lungimea de 28 cm și lățimea de 4 cm, care la partea inferioară prezintă o gîtuitură caracteristică, s-au aplicat spoturile de arie mică și uniformă prin încărcarea repetată a cromatogramelor cu soluția de analizat, urmată de uscare.

Sistemul de solvenți întrebuințat a fost n-butanol + acid acetic + apă (4 : 1 : 5 v/v).

S-au practicat irigări repetate, după care aminoacizii separați pe benzile cromatografice s-au colorat, după uscare, prin pulverizare cu soluție de ninhidrină 0,4% în acetonă.

Identificarea aminoacizilor s-a făcut prin compararea distanțelor de migrare ale aminoacizilor separați, existenți în probele de analizat.

Cromatografierea soluțiilor de analizat și a amestecurilor de aminoacizi martori a fost urmată de densitometrarea lor, ceea ce permite într-o măsură estimarea relativă a aminoacizilor din probele analizate.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Analiza cromatografică a soluțiilor apoase obținute în trapa de captare a permis separarea și identificarea următorilor aminoacizi: lizina, acidul glutamic, acidul aspartic, glicocolul, hidroxiprolina, alanina, prolina, valina, fenilalanina, leucina-izoleucina (fig. 2).

Între aminoacizii obținuți prin descărcări electrice cu electrozi interiori, Miller a semnalat formarea glicocolului, d, l-alaninei, β-alaninei, sarcozinei, acidului d, l, α-amino-n-butiric, menționînd că s-ar fi format și alții pe care nu i-ar fi putut identifica.

În comparație cu lucrarea lui Miller, am obținut un număr mai mare de aminoacizi. Unii aminoacizi s-au format numai prin tipul de descărcare electrică cu electrozi exteriori, folosită de noi.

Noi am identificat în plus lizina, acidul glutamic, acidul aspartic, hidroxiprolina, serina, prolina, valina, fenilalanina, leucina-izoleucina, —aminoacizi neidentificați sau neobținuți de Miller.

Dată fiind concentrația cunoscută a aminoacizilor martori se poate semnala, față de rezultatele menționate de Miller, obținerea și a unor cantități relativ mai mari de aminoacizi. Una din cauzele pentru care Miller relatează obținerea unui număr mare de aminoacizi neidentificați a fost desigur și micile cantități rezultate prin tipul de descărcare utilizat de autor, așa cum era de așteptat.

Cărbunele rezultat ca urmare a întrebuințării electrozilor interiori a constituit încă o cauză care l-a împiedicat să separe și să identifice un număr mai mare de aminoacizi.

Din compararea mărimii ariilor care delimitează curbele densitogramelor rezultă că mai ales hidroxiprolina, alanina și glicocolul sînt aminoacizii obținuți de noi în cantitățile relativ cele mai mari.

CONCLUZII

Supunînd descărcărilor electrice de înaltă frecvenţă un amestec gazos de metan, amoniac şi vapori de apă, corespunzător compoziţiei atmosferei primare a Terrei într-o instalaţie de descărcări electrice de înaltă frecvenţă cu electrozi exteriori, spre deosebire de instalaţiile cu electrozi interiori folosite de alţi autori, s-au obţinut, s-au separat şi s-au identificat cromatografic 11 aminoacizi.

Metoda utilizată în această lucrare a permis să se separe şi să se identifice în plus un număr de 6 aminoacizi şi totodată unii în cantităţi mai mari, — hidroxiprolina, glicocolul şi alanina.

Lucrarea scoate în evidenţă rolul descărcărilor electrice în atmosfera primară a planetei noastre la formarea substanţelor încă din epoca prebiotică a Terrei, întărind astfel ipoteza primului stadiu de evoluţie a originii vieţii.

Prezentat la redacţie
la 26 decembrie 1973

Catedra de chimie fizică
Facultatea de farmacie şi
Academia militară
Bucureşti

CONTRIBUTIONS SUPPORTING THE FORMATION OF AMINO ACIDS PRIOR TO THE APPEARANCE OF LIFE ON THE EARTH. OBTAINMENT OF SOME AMINO ACIDS FROM METHANE, AMMONIA AND WATER BY HIGH FREQUENCY ELECTRIC DISCHARGES

ABSTRACT

The paper supports the formation of a number of eleven amino acids from a gaseous mixture of methane, ammonia and water vapours, bodies prevailing in the reducing atmosphere of lifeless planets, under the action of high frequency electric discharges with external electrodes.

The scheme of the continuous flow installation and the utilized discharge parameters are described.

The following amino acids were identified by Mathias chromatography: lysine, glutamic acid, aspartic acid, glycol, hydroxyproline, alanine, serine, proline, valine, phenylalanine, leucine-isoleucine in relatively larger amounts compared to the amino acids obtained by electric discharges with internal electrodes.

Chromatograms constantly indicate the formation of some alanine derivatives, probably their peptides.

BIBLIOGRAFIE

1. H. Urey, Proc. Natl. Acad. Sci., **38**, 351 (1952).
2. S. Miller, Science, **117**, 528 (1953).
3. S. Miller, J. Am. Chem. Soc., **77**, 2351 (1955).
4. S. Miller, Biochim. Biophys. Acta, **23**, 480 (1957).
5. S. Miller, Ann. N.Y. Acad. Sci., **69**, 260 (1957).
6. S. Miller, H. Urey, Science, **130**, 245 (1959).

ST. CERC. BIOCHIM., 17, 2, 209– 222 (1974)

REFERAT GENERAL

ASPECTE BIOCHIMICE PRIVIND STRUCTURA ŞI METABOLISMUL COLAGENULUI

ELENA GANEA

A. STRUCTURA COLAGENULUI

1. Organizarea macromoleculară

Colagenul este o scleroproteină şi reprezintă cam 30 % din proteinele organismului. Examinat cu ochiul liber, colagenul apare sub formă de fibre late, orientate longitudinal; la microscop apar fibrile numeroase, ondulate, puţin ramificate. La microscopul electronic se observă fibre şi mai mici, denumite microfibrile, care prezintă striaţii transversale cu o perioadă de 680 Å, benzi luminoase alternînd cu benzi întunecate (1). Acest aspect se datoreşte aranjării macromoleculelor de colagen, denumit tropocolagen, în microfibrilă. Aceste molecule, cu o lungime de 3000 Å şi un diametru de 15 Å, sînt aşezate cap la cap, avînd între capete o distanţă de 410 Å, care s-a presupus că ar servi depunerii cristalelor de hidroxiapatită.

Molecula de tropocolagen este alcătuită din 3 lanţuri polipeptidice dintre care două sînt identice (α_1) şi al treilea diferă în compoziţia de aminoacizi (α_2). Fiecare din aceste lanţuri polipeptidice este răsucit într-o spirală care diferă de structura α-helix găsită la majoritatea proteinelor, prin aceea că este mai extinsă, distanţa între doi aminoacizi fiind mai mare decît în mod obişnuit. Cele trei lanţuri spiralate din molecula de tropocolagen se mai rotesc unul în jurul celuilalt, ca într-o frînghie, avînd o axă de rotaţie comună. Spirala fiecărui lanţ şi spirala formată de rotaţia însăşi a lanţurilor diferă între ele atît prin mărimea pasului cît şi prin sensul de rotaţie (spirala mică spre stînga, cea comună spre dreapta) (2). Această structură se numeşte „superhelix" sau „coiled coil structure" (fig. 1).

2. Compoziţia în aminoacizi şi secvenţa lor în moleculă

Colagenul se compune din 19 aminoacizi prezenţi în proporţii diferite, dintre care unul, 3-hidroxiprolina, a fost de curînd descoperit în colagen (3). Între aceşti aminoacizi predomină glicocolul, arginina şi mai ales hidroxiprolina, tirozina se găseşte în cantităţi mici, iar triptofanul

este absent, ceea ce deosebeşte colagenul de proteinele serice; lipseşte de asemenea şi cistina, fapt care îl opune keratinelor (4). Prezenţa hidroxilizinei şi hidroxiprolinei este considerată specifică colagenului, deşi s-a mai relatat şi la alte proteine animale. Secvenţa completă a aminoacizilor în lanţurile polipeptidice nu a fost complet elucidată. Glicocolul ocupă în cea mai mare parte a lanţurilor fiecare al 3-lea loc, încît molecula de tropocolagen ar putea fi considerată ca un polimer al tripeptidului $(gli\text{-}x\text{-}y)_n$.

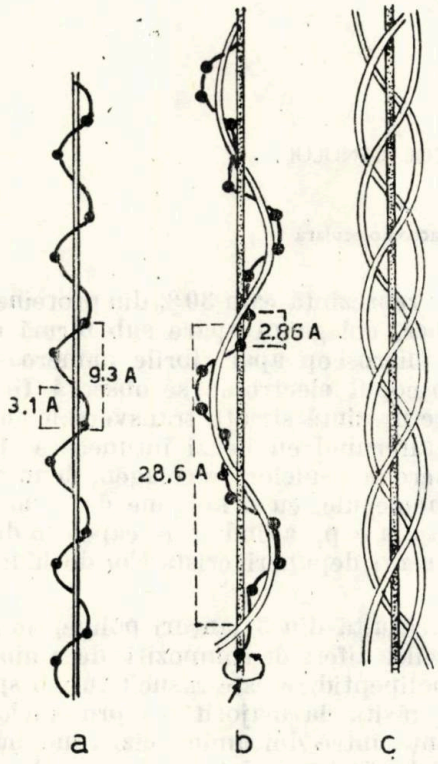


Fig. 1. — Structura macromoleculei de colagen.

a) fiecare din cele trei lanţuri polipeptidice este răsucit în jurul axei sale, spre stînga; distanţa dintre două spire = 9,3Å, iar între doi aminoacizi = 3,1Å.; *b*) fiecare din aceste lanţuri este răsucit şi înjurul unei axe comune, spre dreapta; această spirală are un pas mai mare; *c*) cele trei axe mici răsucite în jurul axei comune.

Acest tripeptid se întîlneşte adesea sub forma gli-pro-*y*, gli-*x*-hipro sau gli-pro-hipro, unde *x* şi *y* pot fi diferiţi aminoacizi. Prezenţa glicocolului are un rol important în această macromoleculă formată din trei lanţuri. Datorită moleculei sale mici el se poate orienta spre centrul macromoleculei, furnizînd gruparea NH pentru formarea de legături de hidrogen cu gruparea CO din alt lanţ al aceleiaşi molecule. De asemenea, prolina, localizată imediat după glicocol avînd N inclus în ciclu, limitează rotaţia lanţului polipeptidic; la fel hidroxiprolina, care este tot un iminoacid, limitează şi mai mult rotaţia (5). Prin hidroliză parţială, acidă sau bazică, s-a obţinut un număr mare de tripeptide şi tetrapeptide ca : -leu-lis--hipro-gli, -leu-lis-pro-gli (6). După digestia cu colagenază a colagenului acidosolubil, solubil în săruri neutre şi a celui insolubil s-a localizat peptidul -gli-gln-hipro-ε-lis (7). S-au studiat polipeptide sintetice similare cu cele obţinute din colagen ca modele pentru structura colagenului (8).

3. Prezenţa glucidelor

Pe lîngă cei 19 aminoacizi prezenţi în proporţii diferite, în colagenul mamiferelor se găsesc şi glucide în cantităţi de 0,01—0,15 %. W. Grassman şi colab. (9) au găsit o fracţiune ce conţine hexoze şi glucozamină şi o altă fracţiune, mai stabilă ce conţine glucoză şi galactoză, considerată ca făcînd parte cu adevărat din molecula colagenului. În legarea acestor hidraţi de carbon de molecula proteică se pare că intervine hidroxilizina cu gruparea sa OH pentru formarea de legături O-glicozidice. Rolul acestor componenţi glucidici este de a stabiliza molecula de colagen. Astfel, pentru a atinge un anumit grad de organizare fibrilară, agregatele de colagen trebuie să interacţioneze cu mucoproteine (10).

4. Legături chimice în colagen

Stabilizarea structurală a colagenului se realizează atît prin legături intermoleculare cît şi intramoleculare. În interiorul macromoleculei se stabilesc legături între cele trei lanţuri polipeptidice (fig. 2) şi chiar între diferite subunităţi ale aceluiaşi lanţ. În colagenul nou format, legăturile dintre cele trei lanţuri ale unei molecule sînt de tip necovalent, putînd

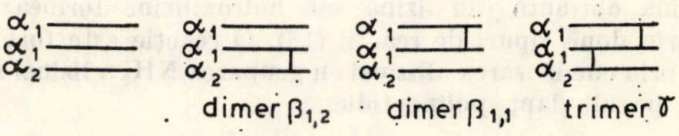
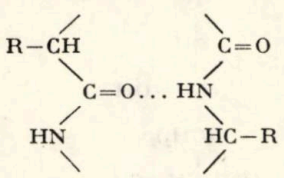


Fig. 2. — Reprezentarea legăturilor încrucişate intra- şi intermoleculare cu formarea subunităţilor polipeptidice $\beta_{1,2}$, $\beta_{1,1}$, γ.

fi uşor rupte. Pe măsura maturizării, atît între lanţurile aceleiaşi molecule, cît şi între moleculele vecine, apar legături mai stabile, de tip covalent mai greu de desfăcut, ruperea lor producînd denaturarea colagenului.

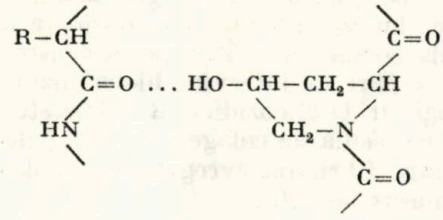
a) Legăturile de hidrogen sînt cele mai reprezentative pentru tipul de legături intramoleculare. Ele se formează între gruparea CO a unui aminoacid dintr-un lanţ peptidic şi gruparea NH a altui aminoacid din alt lanţ sau din alt segment al aceluiaşi lanţ. Gruparea NH este deobicei cea a glicocolului, care este atît de mult prezent în colagen (33 %), iar gruparea CO aparţine prolinei sau altui aminoacid. La acest tip de legătură poate participa şi OH-ul hidroxiprolinei. S-au propus două modele în ce priveşte numărul legăturilor de hidrogen din moleculă: „structura alternativă" care presupune existenţa unei legături pe triplet de aminoacizi şi „structura standard" considerînd două astfel de legături pe triplet. Aceasta din urmă pare mai potrivită pentru explicarea diferitelor proprietăţi ale colagenului, adevărata structură fiind o modificare a „structurii standard" (12).



b) Legăturile ionice se realizează între aminoacizii dicarboxilici sau diaminici ai aceluiaşi lanţ sau a două lanţuri diferite şi sînt importante pentru solubilitatea colagenului.

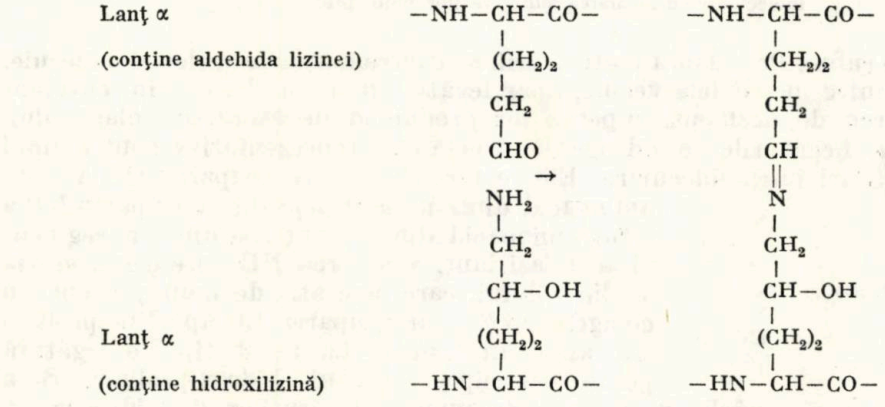
c) Legăturile covalente.

Acest tip de legături se stabileşte fie între grupele funcţionale ale colagenului, fie între acestea şi substanţe străine ca alte proteine, glucide, glicoproteine (13), (14). Din această categorie fac parte şi legăturile dintre carboxilul acizilor aspartic (15), (16), şi glutamic (17) şi hidroxilul aminoacizilor serină, treonină, hidroxiprolină, cu formarea unui ester. Gruparea aldehidă are de asemenea o mare importanţă în realizarea legăturilor încrucişate, care stabilizează molecula de colagen. Aldehida provine de obicei din oxidarea lizinei, iar în ţesutul calcifiat (os, dinţi) din esterii fosforici. Enzima care catalizează oxidarea lizinei sau hidroxilizinei în aldehida corespunzătoare este o aminooxidază.



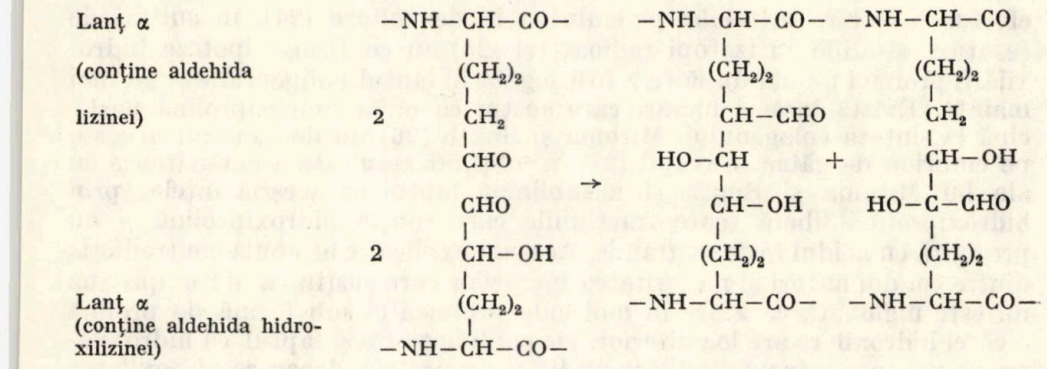
$$R-CH_2-NH_3^+ \rightarrow R-CHO+NH_4^+$$

Aldehida obţinută din lizină sau hidroxilizină formează legături covalente prin două tipuri de reacţii (18). O reacţie este formarea unei baze Schiff prin condensarea allizinei cu gruparea NH_2 a lizinei sau hidroxilizinei de pe alt lanţ polipeptidic.



Legătura aldimină formată nu este prea stabilă, ea poate fi redusă la o legătură mai stabilă. Cu vîrsta numărul legăturilor de acest fel scade, în timp ce numărul total al legăturilor încrucişate din colagen nu scade. Aceasta s-ar explica prin transformarea acestor legături instabile într-o formă stabilă, nereductibilă, fapt ce este în concordanţă cu creşterea stabilităţii fibrei cu vîrsta.

Un alt tip de reacţie este condensarea între două aldehide ale lizinei sau hidroxilizinei cu formare de aldol.



Localizarea acestor legături este la capetele telopeptidice ale moleculei de tropocolagen şi anume la capetele NH_2 terminale ale lanţului α_1 şi α_2, iar după unele indicaţii şi la capătul C-terminal al acestor lanţuri (19).

În afară de cele menţionate mai sus în colagen se mai întîlnesc şi legături prin intermediul moleculelor de apă, legături hidrofobe (la care participă aminoacizi apolari: valina, leucina, izoleucina, tirozina), toate acestea contribuind la realizarea unei structuri cît mai stabile.

B. METABOLISMUL COLAGENULUI

1. Biosinteza

Biosinteza colagenului urmează etapele obişnuite ale biosintezei proteinelor prezentînd anumite particularităţi. Aminoacizii liberi activaţi în prezenţa ATP la aminoacil-AMP, transportaţi de ARNs pe ribozomi, formează după informaţia dată de ARNm un polipeptid bogat în prolină şi lizină, denumit protocolagen. Lanţurile α_1 şi α_2 sînt asamblate simultan (20). Deoarece fiecare lanţ α conţine aproximativ 1000 aminoacizi, ARNm necesari celor două tipuri de lanţuri trebuie să aibă o greutate moleculară de aproximativ 1 000 000 şi este unul din cei mai mari ARNm din natură. Pentru aceasta sînt necesare complexe ribozomale deosebit de mari (21). S-au izolat într-adevăr, astfel de complexe din celulele ce sintetizează colagen (22) deşi există şi alte interpretări în legătură cu aceste complexe. Urmează hidroxilarea unor anumite resturi de prolină şi lizină din molecula de protocolagen cu formarea hidroxiprolinei şi hidroxilizinei. În fine, anumite resturi hidroxilizil sînt glicozilate cu galactoză sau glucozilgalactoză prin legături O-glicozidice înainte ca molecula să fie eliminată în spaţiul extracelular.

a) *Hidroxilarea prolinei şi lizinei şi glicozilarea colagenului.* Se pare că hidroxilarea are un rol important în eliminarea tropocolagenului din

celulă în spaţiul extracelular. Acumularea moleculelor de protocolagen în celulă atunci cînd hidroxilarea este oprită demonstrează rolul biologic al grupărilor OH ale hidroxiprolinei şi hidroxilizinei (23). Numeroase studii efectuate *in vivo* şi *în vitro* pe embrion în dezvoltare (24), în culturi de ţesuturi, studiile cu izotopi radioactivi (25) au confirmat ipoteza hidroxilării prolinei numai după ce a fost legată în lanţul polipeptidic şi nu mai înainte. Există însă şi lucrări care susţin că chiar hidroxiprolina participă la sinteza colagenului. Mitoma şi Smith (26) au demonstrat aceasta pe embrion de găină. Chvapil (27) a obţinut rezultate asemănătoare cu ale lui Mitoma şi Smith şi a subliniat faptul că aceştia înţeleg prin hidroxiprolină liberă toate fracţiunile care conţin hidroxiprolină şi nu precipită cu acidul fosfowolframic. Această explicaţie ar anula contradicţia dintre cei doi autori şi majoritatea lucrărilor care susţin că hidroxiprolina nu este înglobată ca atare în molecula proteică ci sub formă de prolină a cărei hidroxilare are loc ulterior. De subliniat este şi faptul că hidroxilarea se produce într-un stadiu peptidic şi nu proteic, deoarece hidroxilarea unui carbon alifatic nereactiv, necesită o activare preliminară a substratului, ceea ce pare mai potrivit pentru un substrat cu o greutate moleculară mai mică (28).

Enzima răspunzătoare de hidroxilarea prolinei este protocolagen-prolinhidroxilaza (29) (30) (31). Goldberg şi Green (32) au demonstrat că există o proporţionalitate între activitatea hidroxilazei şi rata de sinteză a protocolagenului. Celulele care sintetizează protocolagen sintetizează şi protocolagenhidroxilaza, în timp ce în celulele lipsite complet de sinteza protocolagenului (reticulocite, limfocite) activitatea hidroxilazei este absentă. Aceasta sugerează că protocolagenul ar acţiona ca inductor pentru sinteza enzimei sau că sinteza acestor două proteine ar putea fi controlată de o singură unitate genetică analoagă operonului la bacterii. Reacţia enzimatică necesită prezenţa oxigenului atmosferic, a unei surse de energie (ATP sau creatinfosfat), a acidului ascorbic, α-cetoglutaratului, a ionilor feroşi (33) şi a altor factori specifici ca pH-ul.

Sursa de oxigen pentru gruparea OH din hidroxiprolină nu este apa ci oxigenul atmosferic (34). Condiţiile anaerobe nu împiedică încorporarea prolinei în lanţul polipeptidic ci numai hidroxilarea acesteia. Oxigenarea ulterioară duce la transformarea prolinei din lanţ în hidroxiprolină.

Acidul ascorbic este considerat ca un cofactor al hidroxilazei amintite (35). Faptul că la cobaii scorbutici se întîlneşte o scădere a excreţiei de hidroxiprolină, indicînd o inhibare a hidroxilării protocolagenului, pledează în acest sens. Cicatrizarea dificilă a rănilor la bolnavi de scorbut, este de asemenea o dovadă a unui defect de biosinteză locală a colagenului. În schimb are loc formarea din abundenţă a unui precursor colagenic fără hidroxiprolină. Acest colagen are un grad de stabilitate redus tocmai datorită absenţei hidroxiprolinei care participă la stabilizarea moleculei prin formarea legăturilor de hidrogen. După administrarea vitaminei C, procesul reintră în normal. Windsor şi Williams (36) au studiat efectul administrării acidului ascorbic la bătrîni cu valori scăzute ale acestui compus şi au constatat o creştere a raportului hidroxiprolină totală (μg)/creatinină (mg) cu peste 50%, ceea ce demonstrează o creştere a sintezei colagenului.

Interesant este modul cum acţionează această enzimă pe o moleculă atît de mare ca cea a protocolagenului. O explicaţie ar fi că, într-un singur contact optim, enzima lucrează pe o lungime destul de mare, cam 1/10 din lungimea lanţului α. Pentru a acoperi toată molecula ea s-ar deplasa de-a lungul substratului hidroxilînd resturile prolil, dar dovezi în acest sens nu există încă.

Hidroxilarea lizinei are loc într-un mod asemănător cu cea a prolinei (37), s-a presupus chiar că ar fi vorba de aceeaşi enzimă. Date recente au arătat totuşi că sînt implicate două enzime diferite. Astfel, anumiţi inhibitori ai prolinhidroxilazei nu afectează hidroxilarea lizinei (38).

În secvenţele -gli-*x*-pro- şi -gli-*x*-lis- nu toate resturile prolil şi lizil sînt hidroxilate. Probabil că, secvenţele de aminoacizi apropiate influenţează acţiunea celor două hidroxilaze. Această hidroxilare parţială s-ar putea explica prin faptul că, deşi enzimele respective au o mare afinitate pentru protocolagen, pe măsura hidroxilării, afinitatea lor faţă de substrat scade. Pentru ca reacţia să continue ar fi necesară o cantitate de enzimă foarte mare şi, un timp lung de reacţie, condiţii care nu pot fi realizate în celulă.

Hidroxilizina formată în lanţul polipeptidic este supusă unui proces de glicozilare legînd β-glicozidic galactoza şi glicozilgalactoza. Nu s-a putut încă explica prin ce mecanism unele resturi hidroxilizil nu sînt legate de hexoze altele sînt, şi anume, unele de galactoză, altele de glicozilgalactoză. S-a observat însă că glicozilgalactoza este legată în special de resturile hidroxilizil din secvenţa în care al treilea aminoacid este arginina. Aşadar, enzimele respective acţionează în funcţie de secvenţele de aminoacizi alăturate hidroxilizinei.

b) *Precursorii colagenului.* Moleculele de tropocolagen odată sintetizate, se agregă formînd microfibrile. Problema care a preocupat numeroase laboratoare a fost nu atît modul cum se formează microfibrilele ci mai ales mecanismul prin care este împiedicată agregarea tropocolagenului înainte ca acesta să părăsească celula. S-a pus în evidenţă în celulă o formă de colagen cu o moleculă mai mare decît a tropocolagenului şi care nu se agregă în microfibrile în condiţiile agregării tropocolagenului. Această formă a fost considerată „forma de transport" şi s-a arătat că ea are proprietăţi de solubilizare diferite de ale tropocolagenului (39). După eliminarea din celulă a acestei forme ar avea loc o scindare enzimatică a unor peptide de la capătul amino-terminal, aşa cum se întîmplă şi în cazul fibrinogenului şi moleculele de tropocolagen se agregă spontan în fibrile ca urmare a interacţiei între grupele încărcate din molecule adiacente. Formarea fibrilelor este dirijată de regiunile terminale ale lanţurilor α_1 şi α_2 denumite „telopeptide", zone atipice pentru molecula de colagen atît în ceea ce priveşte repetarea secvenţei -gli-*x*-*y* cît şi spiralarea. Moleculele de tropocolagen insolubile în condiţii fiziologice, se extrag uşor din ţesuturi cu soluţii reci de electroliţi şi de aceea, se mai numesc *colagen solubil.* Cu timpul, tropocolagenul se ramifică formînd un cristaloid tridimensional, care nu mai poate fi solubilizat ci numai denaturat la gelatină prin încălzire sau alte tratamente dure. Acesta este colagenul insolubil. În ţesuturi colagenul poate exista sub următoarele forme :

— colagen insolubil în mediu neutru sau acid, care predomină ;

— colagen acido-solubil, care poate fi extras din țesuturi cu acizi diluați sau tampon citrat;

— colagen neutro-solubil, care poate fi obținut cu soluții saline neutre sau ușor alcaline.

Colagenul insolubil nu poate fi extras din țesuturi decît după denaturarea sa în gelatină prin încălzire cu TCA la 90°C sau încălzire în apă sub presiune. Există o fracțiune ce poate fi extrasă aproape de pH neutru prin încălzire la 60°C, denumită „eucolagen" sau „parent gelatin".

Colagenul acido-solubil denumit și procolagen a fost considerat de unii autori ca precursor al fibrei de colagen. El se întîlnește în fibrele foarte fine ale țesuturilor tinere.

Colagenul neutrosolubil este constituit din tropocolagen, adică din monomerul care participă la formarea fibrilelor.

Asupra adevăratului precursor al colagenului au fost emise mai multe păreri. Orechovitch (27) a relatat că colagenul solubil în citrat este precursorul, în timp ce Harkness și alții (40) arată că fracțiunea neutrosolubilă este adevăratul precursor. Gross, Highberger și Schmitt (41) propun ca precursor colagenic o fracțiune care s-a dovedit prin studii cu izotopi radioactivi a fi fracțiunea solubilă în soluții de săruri neutre. Aparent, cele două fracțiuni solubile în săruri neutre și cea solubilă în citrat par distincte, totuși ele sînt fracțiuni ale unei serii continue de colagen cu diferite solubilități. Trecute în soluție, cele două fracțiuni au proprietăți identice, aceeași compoziție în aminoacizi indiferent de metoda de extracție. Același lucru e valabil și pentru colagenul acidosolubil. Așadar, nu este corect să considerăm ca precursor al colagenului o fracțiune izolată printr-o anumită metodă de extracție, fiecare solvent extrăgînd mai mult sau mai puțin colagen. Totuși, ar putea exista o fracțiune de colagen solubil care să reprezinte un prim stadiu al formării colagenului. Studii recente au stabilit că hidroxiprolina legată, izolată din fracțiunea microzomială după incubarea fragmentelor de granulom cu prolină marcată are o activitate specifică de aproximativ 4 ori mai mare ca activitatea specifică a hidroxiprolinei din colagenul solubil în săruri neutre, deci, colagenul microzomial ar fi primul stadiu de colagen. El poate fi extras cu soluții de săruri neutre ca și colagenul neutrosolubil.

2. Catabolismul colagenului

Degradarea colagenului a fost evidențiată atît în condiții fiziologice, patologice (42) cît și experimentale. Pînă nu de mult se cunoștea o singură enzimă capabilă să denatureze colagenul la pH și temperaturi fiziologice : colagenaza bacteriană izolată din Clostridium. În organismul animal se presupune că ar exista un complex enzimatic capabil să degradeze colagenul. El este blocat în condiții normale de anumiți inhibitori și numai în anumite condiții fiziologice și patologice este deblocat.

Colagenaza bacteriană a fost studiată pe diferite modele experimentale (43) și s-a găsit că ea acționează asupra legăturilor peptidice dintre un aminoacid oarecare și glicocol, necesitînd prezența prolinei sau hidroxiprolinei în poziția anterioară aminoacidului legat de glicocol. În urma acțiunii ei rezultă un tripeptid.

S-au izolat şi colagenaze animale (44) (45) (46) care produc o degradare parţială a macromoleculei de colagen în fragmente care păstrează aspectul de triplu helix. Aceste fragmente reprezintă 1/4 şi 3/4 din moleculă.

În ultimul timp s-au pus în evidenţă aşa-numitele colagenaze adevărate (4) la mormolocul de broască în momentul resorbţiei cozii; ulterior acestea s-au întîlnit şi la diferite animale de laborator (şoareci, cobai, iepuri).

Mecanismul exact prin care fibra de colagen este degradată la aminoacizi nu este pe deplin cunoscut. Lucrări recente (47) (48) au sugerat că pentru degradarea completă a fibrei de colagen este necesară mai întîi participarea unor colagenaze extracelulare şi apoi acţiunea unor proteaze tisulare obişnuite asupra moleculelor denaturate.

Proteazele nu sînt specifice colagenului acţionînd şi asupra proteinelor globulare. Ele lucrează pe ramificaţiile laterale ale moleculei de colagen.

Tripsina acţionează numai asupra colagenului denaturat. Ea desface legăturile situate la capetele macromoleculei clivînd legătura dintre aminoacizi bazici şi glicocol. În urma acţiunii ei scade capacitatea de agregare fibrilară a macromoleculei.

Pepsina acţionează în mod asemănător tripsinei asupra capetelor terminale ale macromoleculei (49).

Catepsinele nu sînt specifice, se găsesc însă din abundenţă în ţesutul unde se resoarbe colagen. Activitatea lor optimă se situează într-o zonă de pH superior pH-ului normal (50), ceea ce a făcut pe unii cercetători să se îndoiască de capacitatea lor de a acţiona *în vivo*.

Pronaza acţionează într-un mod asemănător, activitatea ei fiind invers proporţională cu cantitatea de hidroxiprolină prezentă în colagen.

3. Turnoverul colagenului

Studiile realizate asupra metabolismului colagenului au sugerat că această proteină este mai stabilă decît alte proteine din organism. S-a demonstrat că după injectarea şobolanilor cu glicocol-C^{14} în colagen s-a încorporat mult mai puţină radioactivitate decît în proteinele ficatului. Hidroxiprolina fiind un aminoacid care se găseşte aproape în exclusivitate în colagen se presupune că hidroxiprolin-C^{14} urinară (51) reflectă degradarea *in vivo* a colagenului sau precursorii lui imediaţi (52). Lindstedt şi Prockop (53) au studiat turnoverul colagenului prin injectarea prolin-C^{14} la şobolani şi urmărirea activităţii specifice a hidroxiprolin-C^{14} urinare. Rezultatele sugerează că deşi cea mai mare parte a colagenului din organism este metabolic stabil, există forme care sînt atît rapid sintetizate cît şi degradate în condiţii normale. Colagenul neutrosolubil are o viaţă de înjumătăţire de aproximativ 2 zile, iar fracţiunile solubile în soluţii saline diluate au un turnover şi mai rapid (2—3 ore). Colagenul insolubil s-a presupus că are cel mai lent turnover cunoscut pentru proteinele organismului. Totuşi, acesta diferă de la organ la organ, de la ţesut la ţesut (colagenul din tendon are un turnover lent, cel din piele şi os mai rapid). Există şi diferenţe în funcţie de vîrstă, la animalele tinere

turnoverul este mai rapid decît la cele adulte. Aşadar, colagenul din organism nu poate fi privit ca un pool omogen, deoarece ţesuturile conţin o întreagă varietate de colagen solubil cu viteze diferite de turnover. În mare, se poate considera existenţa unui tip de colagen cu un turnover rapid şi unul cu un turnover lent. Pentru aceste două tipuri de colagen procesele de biosinteză şi degradare diferă. Astfel, absenţa acidului ascorbic care inhibă total biosinteza colagenului cu turnover rapid, nu influenţează biosinteza celui cu turnover lent. Ca urmare, în scorbut cantitatea de colagen din piele este normală dar se produce redeschiderea rănilor cicatrizate.

Studiile cu izotopi radioactivi au demonstrat cel puţin trei componente separate în curbele de excreţie a hidroxiprolinei urinare marcate, indicînd prezenţa a trei pool-uri de hidroxiprolină cu viaţă de înjumătăţire de aproximativ 1 zi, 5 zile şi 50—100 zile. Referindu-ne la studii anterioare putem considera că primele două pool-uri reprezintă forme de colagen solubil, al treilea fiind identificat cu colagenul insolubil (54). Rezultatele obţinute la animale omorîte după 28 de zile de la marcarea radioactivă au indicat că activitatea specifică a hidroxiprolinei urinare este mai mare decît activitatea specifică a colagenului solubil dar, mai mică decît a colagenului insolubil. Aceasta sugerează că cantităţi semnificative de hidroxiprolină urinară provin din colagenul insolubil şi că, după 28 zile de la administrarea aminoacidului marcat se mai găseşte o mică cantitate de colagen solubil marcat. Contribuţia colagenului insolubil la hidroxiprolina urinară poate fi dată prin formula:

$$f_1 x_1 + f_2 x_2 = x_3$$

unde, f_1 = contribuţia fracţională a pool-urilor de hidroxiprolină altele decît colagen insolubil;

f_2 = contribuţia fracţională a colagenului insolubil;

x_1, x_2, şi x_3 = activităţile specifice ale hidroxiprolin-C^{14} în pool-urile din organism: altele decît colagenul insolubil, colagenul insolubil şi urină, respectiv.

Definind $f_1 + f_2 = 100$ se poate calcula procentul de hidroxiprolină marcată excretată, provenind din colagenul solubil şi din colagenul insolubil.

Rezultatele nu indică dacă colagenul insolubil e degradat direct la peptide urinare sau dacă este transformat mai întîi în forme solubile înainte de degradare. De asemenea, nu se cunoaşte dacă colagenul insolubil e degradat cu aceeaşi viteză în toate organele şi ţesuturile.

Lucrări recente au arătat valori crescute ale excreţiei hidroxiprolinei în condiţii în care ne-am aştepta la o viteză crescută de degradare a colagenului sau la un turnover rapid, de exemplu la copii în perioada de creştere (55), în acromegalie (56), boala Paget (57), hipertiroidism (58), scorbut (59).

4. Influenţa hormonilor asupra metabolismului colagenului

Hormonii au un rol important în modificarea diferitelor etape ale metabolismului colagenului. Astfel hormonii tiroidieni în condiţii normale

stimulează sinteza colagenului. În insuficienţa tiroidiană, atît sinteza cît şi degradarea colagenului sînt încetinite (60), în timp ce în hipertiroidism, degradarea colagenului este accelerată iar sinteza este scăzută (61).

Hormonul paratiroidian inhibă sinteza colagenului (62) şi stimulează degradarea tuturor fracţiilor colagenice, acţiunea sa predominînd la nivelul osului.

Hormonul de creştere stimulează sinteza colagenului şi creşterea turnoverului colagenului matur. El stimulează de asemenea hidroxilarea prolinei legate în lanţul peptidic (63).

Glucocorticoizii au în general un efect inhibitor asupra metabolismului colagenului, mucopolizaharidelor şi proteinelor necolagene din ţesutul conjunctiv.

Hormonii estrogeni acţionează în mod diferit asupra diferitelor ţesuturi din organism. Androgenii au în general un efect anabolic deşi mecanismul lor de acţiune nu este binecunoscut.

Acţiunea insulinei asupra colagenului este de asemenea puţin cunoscută. Totuşi, s-a dedus că ea stimulează biosinteza colagenului, din datele obţinute pe pacienţi cu diabet sever care secretă cantităţi scăzute de hidroxiprolină (64).

C. REPARTIŢIA ŞI ROLUL COLAGENULUI LA ANIMALE ŞI OM

1. Colagenul în seria animală

Colagenul există la toate clasele regnului animal fiind mai abundent la vertebrate decît la nevertebrate. Compoziţia sa în aminoacizi diferă între diferite clase. S-a sugerat că regiunea amino-terminală nehelicoidală a lanţului α_2 este deosebit de variabilă în compoziţia şi secvenţa de aminoacizi şi poate contribui la specificitatea de specie a colagenului (65). Pe măsură ce se urcă pe scara zoologică se observă o mai mare stabilitate a colagenului datorită creşterii proporţiei de hidroxiprolină şi o mai mare omogenitate a moleculei de colagen (scade cantitatea de glucide).

2. Colagenul în organismul mamiferelor

Colagenul este proteina cea mai răspîndită în organism constituind 30—35% din proteinele totale. La mamifere toate ţesuturile şi organele conţin colagen, cantităţile variind de la un organ la altul, de la un ţesut la altul. Cele mai bogate în colagen sînt pielea, tendonul, matricea osului, iar cele mai sărace plămînii, muşchii, inima, ficatul. Cantitatea de colagen este în general constantă la organele adulte, dar în anumite condiţii fiziologice se produc modificări.

3. Influenţa vîrstei

Colagenul apare foarte devreme în cursul vieţii embrionare. Cantitatea de colagen creşte în diferite organe pînă la vîrsta adultă, iar în unele cazuri pînă la bătrîneţe. Aceste creşteri corespund unei creşteri a număru-

lui de fibre sau îngroşarea lor. Are loc de asemenea scăderea cantităţii de colagen solubil, creşterea colagenului insolubil.

4. Rolul colagenului în organism

Rolul principal al colagenului în organism este cel de susţinere. Colagenul este considerat constituentul fundamental al „armăturii" care menţine forma diferitelor organe, rol pe care în lumea vegetală îl are celuloza (66). În organismele animale colagenul este mai mult sau mai puţin asociat cu alţi produşi. Astfel, proprietăţile mecanice ale ţesutului conjunctiv sînt dependente de trei tipuri de factori : caracteristicile proprii ale fibrelor (număr, diametru, orientare), natura substanţelor legate de colagen, interacţii între fibre şi aceste substanţe.

Un rol deosebit de important şi de studiat în ultima vreme îl are colagenul din os. Colagenul este proteina matricei osoase pe care urmează să se depună elementele minerale necesare formării microcristalelor anorganice ale osului. Explicaţiile devin din ce în ce mai complexe în ceea ce priveşte rolul matricei organice în procesul de osificare (67). Pe baza a numeroase experienţe (68) putem considera că ATP aduce grupări fosfat în punctele de calcifiere. Pirofosfaţii şi ionii de calciu se combină între ei rămînînd legaţi de grupări ale colagenului, formînd astfel un germen cristalin care creşte pe măsura legării altor ioni de calciu şi fosfat. După unii autori (69) pirofosfatul joacă un rol inhibitor în precipitarea fosfatului de calciu în prezenţa fibrelor de colagen. Grupele pirofosfat sînt scindate de o pirofosfatază atunci cînd a avut loc calcificarea. În ţesuturile conjunctive care nu sînt destinate calcificării, legătura colagen-pirofosfat persistă. Se pare că neutralizarea anumitor grupe ale fibrelor de colagen ca gruparea NH_3^+ a lizinei şi hidroxilizinei duce la pierderea parţială a capacităţii matricei organice de a se mineraliza (70). Cunoaşterea proprietăţilor şi modificărilor colagenului are o mare importanţă în înţelegerea diferitelor procese biologice, cum ar fi creşterea şi dezvoltarea, sau patologice printre care ateroscleroza ocupă un loc deosebit, procese în care este implicată această proteină atît de răspîndită în organism.

Prezentat la redacţie
al 22 ianuarie 1974

Institutul de ştiinţe biologice
Departamentul de Biochimie
Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. T. Nemetschek, W. Grassman, U. Hofmann, Z. Naturforsch., **10**, 61 (1955).
2. M. J. Dallemagne, L. J. Richelle, Presse Méd., **73**, 1915 (1965).
3. J. D. Ogle, R. B. Arlinghaus, N. A. Logan, J. Biol. Chem., **237**, 3667 (1962).
4. A. Delaunay, S. Bazin, Presse Méd., **77**, 547 (1969).
5. M. E. Grant, D. J. Prockop, New Eng. J. Med., **286**, 194 (1972).
6. L. Grimm, W. Grassman, Z. Physiol. Chem., **337**, 161 (1964).
7. H. B. Bensusan, Biochemistry, **8**, 4716 (1969).
8. R. A. Berg, B. R. Olsen, D. J. Prockop, J. Biol. Chem., **245**, 21 (1970).
9. W. Grassman, K. Hannig, H. Endress, A. Riedel, Z. Physiol. Chem., **322**, 71 (1960).
10. M. J. Spiro, R. G. Spiro, J. Biol. Chem., **246**, 4910 (1971).

11. R. GÜNTER, in *Kollagen*, Verlag Theodor Steinkopf, Dresden, 1966, p. 61.
12. G. N. RAMACHANDRAN, E. SASISECHARAN, Y. T. THATHACHARI, în *Kollagen*, editor Ramanathan N., New York, London, 1962.
13. M. B. MATHEWES, Biochem., J., **96**, 710 (1965).
14. W. T. BUTLER, L. W. CUNNIGHAM, J. Biol. Chem., **241**, 3882 (1966).
15. P. M. GALLOP, S. SEIFTER, E. MEILMAN, Nature, **183**, 1659 (1959).
16. O. BLUMENFELD, P. M. GALLOP, Biochemistry, **1**, 947 (1962).
17. H. B. BENSUSAN, Biochemistry, **8**, 4723 (1969).
18. A. J. BAILEY, C. M. PEACH, L. J. FOWLER, Biochem. J., **117**, 819 (1970).
19. A. J. BAILEY, S. P. ROBINS, in *Aging of Connective Tissues Skin*, Ed. L. Robert, B. Robert, S. Karger, Basel, München, Paris, London, N.Y. Sydney., 1973.
20. J. VUUST, K. A. PIEZ, J. Biol. Chem., **245**, 6201 (1970).
21. D. A. LOWTHER, N. W. GREEN, J. A. CHAPMAN, J. Biophys. Biochem., Cytol., **10**, 373 (1961).
22. G. MANNER, R. H. KUTSINGER, B. S. GOULD, Biochim. Biophys. Acta, **134**, 411 (1967).
23. D. J. PROCKOP, K. I. KIVIRIKKO, Ann. Intern. Med., **66**, 1243 (1967).
24. B. PETERKOVSKI, J. Biol. Chem., **238**, 3966 (1963).
25. W. H. DAUGHADAY, I. K. MARIZ, J. Lab. Clin. Med., **59**, 741 (1962).
26. C. MITOMA, J. C., SMITH, J. Biol. Chem., **234**, 78 (1959).
27. M. CHVAPIL, în *Dezvoltarea biochimică în țesutul conjunctiv*, Statni Zadrovtnicke Nakladatelstvi, Praga, 1960, p. 34.
28. N. M. GREEN, D. A. LOWTHER, Biochem. J., **71**, 55 (1959).
29. S. UDENFRIEND, Science, **152**, 1335 (1966).
30. D. J. PROCKOP, K. I. KIVIRIKKO, Ann. Intern. Med., **66**, 1234 (1966).
31. B. GOLDBERG, H. GREEN, Proc. U. S. Nat. Acad. Sci., **59**, 110 (1968).
32. B. GOLDBERG, H. GREEN, Nature, **221**, 267 (1969).
33. J. J. HUTTON Jr., A. L. TAPEL, S. UDENFRIEND, Arch. Biochem. Biophys., **118**, 231 (1967).
34. D. PROCKOP, A. KAPLAN, S. UDENFRIEND, Arch. Biochem. Biophys. **101**, 499 (1963).
35. M. EFRON, E. M. BIXBY, Biochim. Biophys. Acta, **165**, 238 (1968).
36. A. C. W. WINDSOR, C. B. WILLIAMS, Brit. Med. J., **1**, 732 (1970).
37. E. A. POPENOE, P. B. ARONSON, D. D. VAN SLYKE, J. Biol. Chem., **240**, 3089 (1965).
38. E. WEINSTEIN, N. BLUMENKRANTZ, D. J. PROCKOP, Biochim. Biophys. Acta, **191**, 747 (1969).
39. P. DEHM, D. J. PROCKOP, Biochim. Biophys. Acta., **240**, 358 (1971).
40. R. D. HARKNESS, A. N. MARKO, M. M. MUIR, A. NEUBERGER, Biochem. J., **56**, 558 (1954).
41. J. GORSS, J. H. HIGHBERGER, F. O. SCHMITT, Proc. Natl. Acad. Sci., (Wash), **40**, 679 (1954).
42. J. F. WOESSNER, J. Gastroenterol. **18**, 220 (1963).
43. E. WÜNSCH, H. G. HIEDRICH, Z. Physiol. Chem., **333**, 149 (1963).
44. J. GROSS, C. M. LAPIERE, Proc. Natl. Acad. Sci., **48**, 1014 (1962).
45. S. E. ZIFFREN, R. T. HOSIE, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **90**, 650 (1955).
46. G. S. LAZANUS, J. R. DANIELS, R. S. BROWN, H. A. BLADEN, H. M. FULLMER, J. Clin. Invest., **47**, 2622 (1968).
47. A. Z. EISEN, E. A. BAUER, J. JEFFREY, J. Invest. Dermat., **55**, 359 (1970).
48. A. Z. EISEN, J. Lab. Clin. Med., **75**, 258 (1970).
49. F. O. SCHMITT, A. J. HODGE, J. Soc. Leather, Tr. Chem., **44**, 217 (1960).
50. J. F. WOESSNER, T. H. BREWER, Biochem. J., **89**, 75 (1963).
51. M. STETTEN, J. Biol. Chem., **181**, 31 (1949).
52. D. J. PROCKOP, Fed. Proc. **21**, 169 (1962).
53. S. LINDSTEDT, D. J. PROKOP, J. Biol. Chem., **236**, 1399 (1961).
54. D. J. PROCKOP, J. Clin. Invest., **43**, 453 (1964).
55. J. D. SMILEY, M. ZIFF, Physiol. Rev., **44**, 30 (1964).
56. H. E. JASIN, C. W. FINK, W. WISE, M. ZIFF, J. Clin. Invest., **41**, 1928 (1962).
57. T. A. DULL, J. Clin. Invest., **41**, 1355 (1962).
58. H. E. KEISER, J. Clin. Invest., **41**, 1371 (1962).
59. G. R. MARTIN, S. E. MERGENHAGEN, D. J. PROCKOP, Nature, **191**, 1008 (1961).
60. K. I. KIVIRIKKO, O. LAITINEN, B. A. LAMBERG, J. Clin. Endocr. Metab., **25**, 1347 (1965).
61. K. I. KIVIRIKKO, M. KOIVUSALO, O. LAITINEN, B. A. LAMBERG, J. Clin. Endocr., **24**, 222 (1964).
62. B. FLANAGAN, G. NICHOLS, Endocrinology, **74**, 180 (1964).
63. E. DINULESCU, L. SIMIONESCU, I. FLOREA, V. IONESCU, E. GANEA, Rev. roum. endocrinol., **6**, 221 (1969).

64. J. B. Eisinger, *L'Hydroxyprolinurie. Affections endocriniennes et methabolisme.* These Fac. Med. Pharm., Marseille, 1967.
65. P. Bornstein, R. Nesse, Arch. Biochem. Biophys., **138**, 443 (1970).
66. A. Delaunay, S. Bazin, Presse Med., **77**, 755 (1969).
67. M. J. Dallemagne, L. J. Richelle, Presse Med., **73**, 1915 (1965).
68. T. Cartier, J. Bicard, Bull. Soc. Chim. Biol., **37**, 1169 (1955).
69. H. Fleish, V. F. Neuman, J. Am. Chem. Soc., **82**, 3783 (1960).
70. Ch. M. Lapiere, în *Calcified tissues*, Ed. Fleish, H.J.J. Blackwood, Springer Verlag, Berlin, 1966.

ST. CERC. BIOCHIM., 17, 2, 223–236 (1974)

J.N. DAVIDSON, *The Biochemistry of the Nucleic Acids* (Biochimia acizilor nucleici), Science Papertacks, London, 1972, ediția a VII-a revizuită, 396 p.

A șaptea ediție a „Biochimiei acizilor nucleici", care apare după numai patru ani după ediția anterioară, sumarizează cunoștințele acumulate în domeniul acizilor nucleici pînă în anul 1972. Apariția ei a fost determinată de numărul imens de date care în ultimii ani au contribuit la lămurirea unor probleme legate de conformația, biosinteza și rolul biologic al acizilor nucleici. Această ediție diferă mult de celelalte; s-a eliminat materialul învechit, s-au rearanjat capitolele și s-au adus la zi. Ea este utilă tuturor biologilor și chimiștilor care țin să cunoască acest domeniu și să fie la zi cu ultimele lucrări, conferințe și monografii.

Volumul cuprinde 14 capitole care tratează despre: repartiția intracelulară a acizilor nucleici, constituția lor chimică, metodele de izolare și caracterizare, structura acizilor nucleici, enzimele care intervin în metabolismul acizilor nucleici, sinteza proteinelor și catabolismul acizilor nucleici.

În noua ediție sînt extinse datele cu privire la structura primară și determinarea secvențelor acizilor ribonucleici și a structurii secundare și terțiare a acizilor dezoxiribonucleici. Capitolul de biosinteză a acizilor dezoxiribonucleici cuprinde lucrări recent apărute asupra DNA polimerazei II și III ca și discuții asupra reverstranscriptazei, în timp ce capitolul de biosinteză a acizilor ribonucleici aduce la zi ultimele cunoștințe referitoare la RNA polimeraza din E. coli și la procesul de posttranscripție. A fost considerabil modificat capitolul de sinteză a proteinelor.

Lilica Boloșeneanu
Departamentul de biochimie
București

Aging of connective tissues-skin (Îmbătrînirea țesutului conjunctiv — pielea) Ed. L. Robert și B. Robert, Cretèil, S. Karger, Basel—München — Paris—London — New York—Sydney, 1973, 225 p.

Această carte reprezintă primul volum din seria „Frontiers of matrix biology" și cuprinde lucrările celui de al XI-lea colocviu internațional de dermochimie, ținut la Paris, la 24 noiembrie 1972.

Studiile din ultimii ani referitoare la biologia țesutului conjunctiv fiind dispersate în diferite reviste de specialitate, a devenit necesară apariția unei astfel de serii, care se va ocupa în

amănunt de aspectele chimice, biologice şi medicale ale matricei intercelulare. Volumul de faţă urmăreşte o problemă ce se află în centrul preocupărilor biologiei şi medicinei, anume îmbătrînirea. Interesul pentru acest subiect este nu numai ştiinţific, ci şi social, pentru prevenirea unora din maladiile insuficient cunoscute pînă în prezent şi care reflectă adesea modificări ale formei şi funcţiei ţesutului conjunctiv, în funcţie de vîrstă.

Cele 9 lucrări prezentate se referă la diferite aspecte ale studierii ţesutului conjunctiv. Pornind de la ideea că pentru a înţelege îmbătrînirea trebuie să cunoaştem mai întîi dezvoltarea şi diferenţierea acestui ţesut, B. Robert şi L. Robert prezintă cîteva consideraţii generale asupra modificărilor întîlnite în îmbătrînirea ţesutului conjunctiv, încercînd să le explice prin prisma teoriilor celulare şi moleculare ale îmbătrînirii. În acelaşi sens este şi lucrarea lui A. Macieira-Coelho, care sugerează că pierderea capacităţii de diviziune celulară în timpul îmbătrînirii se poate datora unor mecanisme deficiente la nivelul sintezei ARNr. M. Prunieras se ocupă de îmbătrînirea epidermei, studiind îmbătrînirea keratinocitelor în situ şi în culturi de celule, în timp ce R. Fleischmajer şi colab. descriu rezultatele obţinute asupra îmbătrînirii dermului uman.

Modificările chimice ale colagenului cu vîrsta, formarea şi creşterea numărului de legături încrucişate în colagen, ca şi localizarea lor, rolul lanţurilor α_2 sînt probleme incomplet elucidate pînă în prezent şi la care încearcă să răspundă lucrările lui E. Heikkinen şi A.J. Bailey, precum şi S.P. Robins.

Proprietăţile reologice ale pielii (elasticitate, plasticitate, vîscozitate) sînt descrise în capitolul semnat de A. Viidik.

H. Bouisson şi colab. prezintă îmbătrînirea pielii în legătură cu ateroscleroza şi ateromul, demonstrînd paralelismul dintre îmbătrînirea cutanată şi cea vasculară.

Volumul se încheie cu lucrarea lui F. Bourliere, care este un studiu comparativ al proprietăţilor şi funcţiilor pielii la vertebrate, mamifere şi primate.

Elena Ganea

Departamentul de biochimie
Bucureşti

Biochemistry of cell differentiation (Biochimia diferenţierii celulare). Vol. 24. Editat de A. Monroy şi R. Tsanev. Academic Press, London—New York, 1973, 179 p.

Volumul de faţă reprezintă una din cele trei cărţi editate cu prilejul celui de al VII-lea Congres FEBS, ţinut în septembrie 1971 la Varna, în Bulgaria. Cartea abordează una din cele mai importante probleme ale biologiei moderne : aceea a diferenţierii celulare la eucariote. Sînt prezentate mecanismele moleculare ale acestui complicat proces, ca sinteza proteinelor specifice anumitor ţesuturi, interrelaţiile dintre citodiferenţiere şi replicarea DNA, sinteza RNA şi altele. În cele 21 lucrări incluse în volum se găsesc conturate cu claritate diferite faţete ale procesului biochimic de diferenţiere celulară, dintre care spicuim : implicarea genelor ribozomale în oogeneza amfibiilor, utilizarea cromozomilor giganţi de diptere în investigarea activităţii genelor, inhibiţia eritropoezei de către bromodeoxiuridină, semnificaţia fiziologică a unor inhibitori biologici specifici sintezei proteice în celulele diferenţiate, creşterea şi diferenţierea din culturi de celule epidermice, diferenţierea celulară corelată cu metabolismul secundar al microorganismelor, etc. Un alt aspect interesant este acela al markerilor biochimici necesari cercetării stadiului de dife-

renţiere celulară, dintre care amintim hemoglobina, proteinele musculare, unele secreţii glandulare, enzimele (glutamin sintetaza se bucură de o documentată lucrare).

Metodele de studiu utilizate sînt dintre cele mai moderne, îmbinîndu-se cele histologice cu cele biochimice de separare, cele statistice cu cele descriptive, drept material servind atît plantele cît şi animalele.

Fiecare lucrare se caracterizează printr-o ţinută grafică ireproşabilă şi este completată cu o listă bibliografică cuprinzătoare. Cartea se încheie cu un index de autori şi unul de subiecte, fapt care uşurează munca celor interesaţi în problematica atacată în acest volum. Interesul cărţii rezidă în aceea că aduce completări valoroase datelor fundamentale ale diferenţierii celulare.

Ioana Hagima

Centrul de biostructură
Bucureşti

Effect of carbohydrates on lipid metabolism (Efectul carbohidraţilor asupra metabolismului lipidelor), editor: I. Macdonald, editura S. Karger, Basel—München—Paris—London—New York—Sidney, 1973, X + 310 pag., 24 fig., 38 tab.

Prezenta lucrare este volumul 8 din seria *Progress in Biochemical Pharmacology* (editorul seriei: R. Paoletti) şi la realizarea ei şi-au adus contribuţia şapte autori, care tratează aspecte diverse ale interrelaţiilor dintre carbohidraţi şi lipide. Domeniile abordate includ: o enumerare a enzimelor implicate în aceste interrelaţii (F. Heinz), prezentarea biosintezei lipidelor (I.R. Kupke), o trecere în revistă a circuitului trigliceridelor în organismul uman, precum şi a efectelor carbohidraţilor din alimentaţie asupra acestuia (P.J. Nestel), o prezentare a corelaţiei dintre sinteza acizilor graşi şi influenţa pe care fructoza din alimente o are asupra sintezei hepatice a a lipidelor (D. Zakim), o prezentare a efectelor ingerării de carbohidraţi asupra metabolismului ţesutului adipos (A. Vrána şi P. Fabry) şi, în sfîrşit o scurtă analiză a influenţei carbohidraţilor din alimentaţie asupra lipidelor serice (I. Macdonald), urmată de aspectele patologice ale implicării carbohidraţilor în metabolismul lipidelor, rolul lor posibil în ateroscleroză (Margaret J. Albrink) şi metabolismul trigliceridelor în *Diabetes mellitus* (E.A. Nikkilă).

Prin problematica abordată şi prin vasta bibliografie ce o include, volumul este deosebit de oportun pentru cunoaşterea unui domeniu important al metabolismului.

Cornelia Mihai

Institutul oncologic
Bucureşti

PAUL L. WOLF, DOROTHY WILLIAMS, TASHIKO TAUDAKA, LETICIA ACOSTA, *Methods and techniques in clinical chemistry* (Metode şi tehnici în chimia clinică), ed. John Wiley & Sons, New York—London—Sidney—Toronto, 1972, 417p.

Cartea de faţă, pe lîngă că umple un gol tot mai mult simţit, este de un real folos pentru obţinerea unei eficienţe sporite în laboratorul clinic.

Ţinînd seama de explozia de informaţii din ultimii 15 ani în domeniul chimiei clinice, această carte a încercat să adune toate testele folosite în mod curent în laboratoarele clinice în care lucrează autorii, dar care sînt disparate în diverse tratate sau manuale. Accentul se pune în special pe aspectele practice ale chimiei clinice.

Se descriu analize de : enzime (fosfatază alcalină şi acidă, aldolază, amilază, colinesterază, creatinfosfochinază, glucozoxidază, glucozo-6-fosfat dehidrogenază, lactat dehidrogenază, leucin amino peptidază, lipază, izocianat dehidrogenază, sorbitol dehidrogenază, gamma-glutamiltranspeptidază, transaminaze), barbiturice şi sedative, acizi organici, aminoacizi, hormoni, vitamine, pigmenţi biliari, lipide, analize gastrice, analize de sînge şi urină, dozări de anioni şi cationi şi altele.

Prin amplul domeniu pe care-l abordează şi prin felul în care sînt descrise principalele etape ale unei analize (principiul metodei, reactivi şi aparatură, mod de lucru, valori normale, bibliografie, interpretare clinică a rezultatelor), cartea *Metode şi tehnici în chimia clinică* este şi sub acest aspect un manual valoros, de un real folos pentru clinicienii patologi, tehnicienii medicali, chimiştii clinicieni şi biochimiştii interesaţi în problemele de diagnostic clinic chimic.

În plus, ea poate servi ca mijloc de orientare pentru cei care se ocupă de aprovizionarea şi utilarea laboratoarelor cu aparatură şi materiale.

Corina Mihail

Departamentul de biochimie
Bucureşti

FREDERICK A. PUTT, *Manual of histopathological staining methods* (Manual de metode de colorare histopatologică), ed. John Wiley & Sons, New York—London—Sydney—Toronto, 1972, 335 p.

Metodele prezentate în acest manual includ procedee speciale şi tehnici histochimice care se folosesc în laboratoarele de histologie.

Experienţa şi îndeminarea bine cunoscută a autorului în mînuirea tehnicilor histologice sînt o carte de vizită care face ca prezentarea cărţii să constituie numai o luare la cunoştinţă pentru cei care lucrează în acest domeniu.

Sînt prezentate atît metodele clasice, cît şi metode moderne, cu o discuţie detaliată asupra tuturor accesoriilor importante folosite în procedeele de colorare, fixare, decalcificare, deshidratare, etc. Sînt incluse şi anumite consideraţiuni referitoare la principiile de bază ale tehnicilor de colorare, precum şi la criteriile de alegere a unei tehnici în locul alteia.

Cartea cuprinde 15 capitole.

Capitolul 1 se ocupă de frotiuri şi biopsii, capitolul 2 dă detalii asupra procedeelor de fixare, în capitolul 3 este descrisă metoda secţionării la rece. Capitolul 4 este consacrat procedeului de decalcificare. Capitolul 5 indică în ce constă metoda cu parafină. Capitolul 6 se ocupă de ascuţirea şi îngrijirea cuţitelor microtomului. Capitolul 7 se referă la metoda cu nitroceluloză. Capitolul 8 dă detalii asupra accesoriilor necesare colorării. Capitolul 9 tratează despre coloranţi şi colorare. Capitolul 10 se ocupă de deshidratare, curăţire şi montare. Capitolul 11 redă amănunţit procedeele de colorare prin care pot fi vizualizate histologic cele mai variate componente tisulare, fluide biologice, organe, formaţiuni subcelulare etc. Capitolul 12 se ocupă de componentele tisulare ale sistemului nervos, cu indicaţii asupra metodelor histochimice prin care ele pot fi studiate (ex : colorare cu metale, etc.). Capitolul 13 este consacrat procedeelor de păstrare a mostrelor (eşantioanelor) pentru scopuri didactice. În capitolul 14 este descrisă modificarea metodei indicate de Gough şi Wentworth pentru montarea pe hîrtie a secţiunilor organului în totalitatea sa. Capitolul 15 conţine indicaţii despre metoda Weibel pentru montarea secţiunilor pe film de plastic.

Cartea de faţă, pe lîngă că va fi un îndreptar preţios, prin grija deosebită a autorului pentru detalii clare şi precise în descrierea tehnicilor histochimice, are meritul de a cuprinde un index de subiecte şi un bogat material bibliografic repartizat în cadrul fiecărui capitol în parte, precum şi o listă a cărţilor şi publicaţiilor originale din domeniul histologiei.

Corina Mihail

Departamentul de biochimie
Bucureşti

Lymphocytic choriomeningitis virus and other arenaviruses (Virusul coriomeningitei limfocitare şi alte arenavirusuri), Ed. F. Lehmann-Grube, Springer Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1973, 339 pag.

Volumul conţine lucrările prezentate în cadrul unui Simpozion a cărui tematică a fost dedicată în exclusivitate arenavirusurilor şi care a avut loc între 16—18 octombrie 1972 la Institutul de virologie experimentală şi imunologie „Heinrich Pette" al Universităţii din Hamburg. Manifestarea, organizată de J. Hotchin, F. Lehmann-Grube şi C.A. Mims, a reunit 46 cercetători din Anglia, Australia, Danemarca, Republica Federală Germania şi S.U.A. Lucrările prezentate cu acest prilej reprezintă atît achiziţii recente cît şi sinteze ale unor studii anterioare ce au permis, începînd din 1969, conturarea şi caracterizarea grupului arenavirusurilor. Rolul atribuit acestora în patologia umană şi animală, ca şi implicaţiile de ordin epidemiologic ce decurg din particularităţile lor, au făcut ca atenţia ce li s-a acordat să fie din ce în ce mai mare. Avînd ca prototip virusul coriomeningitei limfocitare (LCM virus), grupul arenavirusurilor cuprinde în prezent şi virusurile : Ampari, Junin, Lassa, Latino, Machupo, Parana, Pichinde, Pistillo, Tamiami şi Tacaribe. Caracteristicile lor morfologice şi de multiplicare sînt asemănătoare şi, cu excepţia virusului febrei Lassa, care nu a fost izolat pînă în prezent decît de la om, celelalte virusuri au ca gazdă naturală rozătoarele, de la care se infectează şi omul. La animal ele pot determina atît boala acută cît şi infecţii latente, transmise congenital, de-a lungul mai multor generaţii. Acest ultim aspect constituie o particularitate importantă a biologiei acestor virusuri, studiul lor oferind posibilităţi de elucidare, prin extrapolare, a unora din problemele extrem de importante

ale imunopatologiei umane. Așa cum arată F. Lehmann-Grube, în prefața volumului, „interacțiunea între virusul LCM și șoarece este considerată ca un excelent model pentru studiul unei varietăți de fenomene de importanță biologică și medicală, cum sînt toleranța imunologică, imunopatologia virală, bolile virale lente și infecțiile virale latente..".

Cuprinsul volumului este împărțit în 2 capitole mari, subîmpărțite în secțiuni. După o introducere generală, primul capitol, referitor la virusul coriomeningitei limfocitare (LCM virus), conține 4 secțiuni în care sînt prezentate lucrări asupra purificării, proprietăților chimice și fizice și antigenului fixator de complement (S); studii privind interacțiunea virusului LCM, cu celulele și antigenele noi celulare induse de virus; cercetări asupra infecției persistente in vitro și in vivo și fenomenele de interferență; date asupra bolii acute și cronice determinate de virusul LCM la om și animale. În cel de-al 2-lea capitol, referitor la alte arenavirusuri, sînt lucrări asupra grupului febrelor hemoragice determinate de virusurile Tacaribe, Pichinde, Tamiami, Machupo, Latino și Junin, precum și o sinteză asupra virusului febrei Lassa.

Specialiștii pot găsi în acest volum explicații, posibilități de aplicare practică a datelor cunoscute pînă în prezent, precum și direcții noi de cercetare.

Volumul are bibliografie la fiecare lucrare.

Alexandru Petrescu
Institutul de virusologie „Șt. S. Nicolau"
București

VOLKER NEUHOFF, *Micromethods in Molecular Biology* (Micrometode în biologia moleculară), cu contribuțiile lui G.F. Bahr, P. Dörmer, J.E. Edström, U. Leemann, G.M. Lehrer, F. Ruch, H.G. Zimmer, Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1973, 275 fig. 428 p.

Acest volum, al 14-lea din seria „Biologie moleculară, biochimie și biofizică", este un manual practic deosebit de util și binevenit. Cartea prezintă — într-un mod clar, amănunțit și cu o ilustrație grafică excepțională — diferite micrometode foarte sensibile și aplicarea lor la rezolvarea problemelor biologiei moleculare.

Prefața volumului accentuează avantajele utilizării micrometodelor, și anume sensibilitatea mare a determinărilor și economia de timp de lucru.

Pe parcursul celor 16 capitole ale volumului sînt descrise pe larg: micro-disc electroforeza, micro-electroforeza în geluri în gradient, focalizarea izoelectrică la scară micro, detectarea în microgeluri a DNA- și RNA-polimerazei și dehidrogenazelor, micro-determinarea aminoacizilor cu clorură de dansyl, microdeterminarea fosfolipidelor, tehnici de microdifuzie și centrifugare capilară, microfotometrie, citofluorometrie, autoradiografie cantitativă și diferite alte metode. Toate metodele sînt descrise în detaliu, astfel încît experimentatorul să le poată folosi cu ușurință sau adapta domeniului său de lucru.

Literatura corespunzătoare fiecărui capitol și indexul de subiecte care încheie volumul ușurează consultarea acestuia.

Noutatea multora din micrometodele prezentate, ca și caracterul practic al cărții, fac ca volumul de față să fie deosebit de util tuturor cercetătorilor interesați.

Doina Popov
Centrul de biostructură
București

LOTHAR SACHS, *Statistische Methoden* (Metode statistice), Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1972, 5 fig., 25 tabele, 105 pag.

Aflat la a doua sa ediţie, volumul de faţă reprezintă un ajutor pentru cei care, lucrînd în domeniul ştiinţelor naturii, medicinii, tehnicii, economiei, psihologiei sau sociologiei, apelează la metode statistice de analiză şi interpretare a datelor experimentale.

Pe parcursul celor 9 capitole sînt dezvoltate principalele noţiuni şi probleme ale metodelor statistice : valori medii, variabilitate, frecvenţa de distribuţie, domeniul de fidelitate, corelaţie, regresie etc. Un capitol aparte este rezervat testelor statistice. De o deosebită valoare pentru experimentatorul din domeniul ştiinţelor naturii este capitolul referitor la numărul de observaţii necesar pentru calcularea deviaţiei standard a valorii medii sau pentru compararea a două valori medii.

În încheiere volumul conţine un index de subiecte, observaţii finale şi indicaţii de folosire a tabelului ataşat volumului.

Modul sistematic de prezentare a subiectului, grafica şi formatul cărţii, servesc pe deplin scopului propus, de ghid la rezolvarea diferitelor probleme statistice ivite în practica curentă.

Doina Popov

Centrul de biostructură
Bucureşti

N-nitroso compounds analysis and formation (Analiza şi formarea compuşilor N-nitrozo), Edit. P. Bogovski, R. Preussman, E.A. Walker, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1972, 140 p.

Volumul de faţă înmănunchiază lucrările conferinţei organizate de Agenţia Internaţională de Cercetare a Cancerului, în colaborare cu Centrul de Cercetări asupra cancerului din Heidelberg, între 13—15 octombrie 1971.

Cunoscută fiind capacitatea compuşilor N-nitrozo de a induce cancerul experimental la rozătoare, lucrările cuprinse în volum aduc contribuţii de seamă la analiza prezenţei şi formării acestor compuşi în mediul ambiant, în hrană şi *in vivo*.

Cartea cuprinde un cuvînt înainte (autor J. Higginson), lista participanţilor şi lucrările prezentate, grupate în două părţi, intitulate : analiza compuşilor N-nitrozo (16 articole) şi formarea compuşilor N-nitrozo (9 articole). În prima parte sînt relevate importanţa analizei compuşilor N-nitrozo în cercetarea internaţională a cancerului (autor P. Bogovski) şi principalele metode de determinare a compuşilor N-nitrozo volatili şi nevolatili. Pentru determinarea compuşilor N-nitrozo volatili sînt adecvate metodele gaz-cromatografice (articolul „Detectarea compuşilor N-nitrozo dintr-un extract de ulei de soia, prin gaz-cromatografie", autori : L. Hedler, H. Kaunitz, P. Marquardt, H. Fales, R.E. Johnson) şi cele gaz-cromatografice combinate cu spectrometria de masă (articolele „Folosirea distilării în vacuum şi a gaz-cromatografiei — spectro-

metriei de masă pentru detectarea concentraţiilor scăzute de nitrozamine volatile din hrană", autor D.R. Osborne şi „Combinarea gaz-cromatografiei şi spectrometriei de masă în analiza nitrozaminelor şi aplicarea ei la produşii reacţiei Maillard", autori K. Heyns, H. Koch şi H. Röper.

Din cea de-a doua parte a volumului menţionăm ca reprezentative lucrările : „Experienţe *in vivo* şi *in vitro* asupra formării compuşilor N-nitrozo din amine sau amide şi nitraţi sau nitriţi" (autori J. Sander, F. Schweinsberg), „Producerea nitrozaminelor de către bacterii, *in vitro* şi *in vivo* (autori M.J. Hill şi G. Hawksworth) şi „Formarea nitrozaminelor din precursori în fumul de tutun" (autor G.B. Neurath).

Fiecare din cele două părţi ale volumului cuprinde rezumatul concluziilor desprinse din lucrările prezentate şi raportul subcomitetelor respective, împreună cu recomandări pentru cercetările viitoare.

Volumul reprezintă o contribuţie la căutarea unor metode reproductibile şi standardizate de analiză a compuşilor N-nitrozo şi la elucidarea căilor de formare a acestor compuşi în mediul ambiant şi *in vivo*. În aceasta constă actualitatea şi importanţa publicării acestui volum.

Doina Popov

Centrul de biostructură — Bucureşti

Evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man. vol. 2. *Some inorganic and organometallic compounds* (Evaluarea riscurilor de cancerizare prezentate pentru om de către unele chimicale. vol. 2, Unii compuşi anorganici şi organometalici), International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, 1973, 181 pag.

Volumul cuprinde lucrările discutate în cadrul unor sesiuni ţinute la Lyon în octombrie şi decembrie 1972.

În primul rînd se expun scopurile pe care le urmăreşte programul IARC în ceea ce priveşte evaluarea riscurilor de cancerizare prezentate pentru om de către unele substanţe chimice ; unul dintre punctele acestui program este alcătuirea unor monografii. Pentru acest lucru se acordă prioritate, în special ,acelor substanţe despre care există unele date care să le indice carcinogenitatea, iar evaluarea se bazează numai pe lucrări publicate sau acceptate pentru publicare. În evaluarea riscurilor ca o substanţă să fie cancerigenă s-au luat în consideraţie următorii parametri : răspunsul animalelor de laborator la substanţa respectivă, aspecte cantitative, calitative şi puritatea substanţei respective, extrapolarea de la animal la om, date care să demonstreze carcinogenitatea agentului pentru om, amestecuri şi grupuri de substanţe carcinogene.

Monografia de faţă se ocupă de riscurile pe care le prezintă diferitele tipuri de asbesturi, arsenul, cadmiul, cromul, nichelul şi derivaţii anorganici ai acestora, derivaţii tetraetil şi tetrametil de plumb şi complexele fierului cu unele glucide (dextran, dextrin, sorbitol — acid citric, oxid de fier zaharat).

Volumul conţine un index cumulativ pentru monografia anterioară din aceeaşi serie.

Gabriela Romalo

Institutul oncologic Bucureşti

Lehrbuch der Medizinischen mikrobiologie (Curs de microbiologie medicală) editat de H. Reploh şi H.-J. Otte, ediţia a III-a, editura Gustav Fischer, Stuttgart, 1968, 87 fig., 625 pag.

Progresele ştiinţifice din ultimii ani în diferitele domenii ale microbiologiei medicale şi ale bolilor infecţioase au determinat editarea unui nou manual pentru această disciplină.

Materialul prezentat în manualul de faţă şi elaborat de specialişti în materie cuprinde o parte generală, care se referă mai ales la bazele teoretice ale microbiologiei medicale (ca de pildă bazele fiziologiei bacteriilor, genetica bacteriilor, bazele imunologiei, imunopatologiei, epidemiologiei şi altele) şi la tehnicile microbiologice (aspectele multilaterale ale vaccinărilor, dezinfecţia, sterilizarea, dezinsecţia, chimioterapia, tehnica bacteriologică şi serologică etc.), apoi o parte specială consacrată bacteriilor, protozoarelor, fungilor, rickettsiilor şi virusilor, precum şi bolilor provocate de acestea. Capitolele se succed în ordinea recomandată de sistematica microbiologică internaţională. În fiecare capitol al părţii speciale sînt prezentate clar şi concis proprietăţile agenţilor patogeni, bolile cu patogeneza lor, aspectele clinice, imunitatea şi terapia, epidemiologia, profilaxia şi posibilităţile diagnosticării.

Capitolele sînt scrise fiecare în parte de cîte un specialist recunoscut şi se termină cu o parte bibliografică în strînsă legătură cu materialul prezentat în cuprinsul lor. În ciuda numărului mare de coautori, materialul este prezentat unitar, sistematic şi dă o bună privire de ansamblu asupra stadiului actual al cercetărilor din acest domeniu. Cartea apărută în condiţii grafice excelente, conţine numeroase figuri, scheme, tabele sinoptice şi se adresează nu numai studenţilor, dar şi medicilor, biologilor şi lucrătorilor din centrele antiepidemice.

Un index pe subiecte şi o prezentare centralizată a manualelor şi cursurilor cu renume internaţional din această ramură a biologiei şi medicinei completează în mod util materialul prezentat în acest volum.

Horst D. Schell
Departamentul de biochimie
Bucureşti

Results and problems in Cell differentiation, volume 4. *Developmental Studies on Giant Chromosomes* (Rezultate şi probleme ale diferenţierii celulare, vol. 4. Studii de dezvoltare asupra cromozomilor gigantici), ed. W. Beermann, Springer-Verlag Berlin—Heidelberg—New York, 1972, 226 p., 110 fig.

Studiul cromozomilor gigantici din glandele salivare de *Drosophila melanogaster* şi *Chironomus tentans*, cunoscuţi încă din 1933, este abordat cu mijloacele „moderne" ale microscopiei electronice, marcajului radioactiv etc. Se prezintă sintetic rezultatele cantitative ale celor mai acu-

rate lucrări asupra fiziologiei cromozomilor gigantici, insistîndu-se în special asupra aportului respectivelor lucrări la problema diferenţierii celulare. Pentru a fi cît mai concludente, s-au selectat acele lucrări în care fenomenul este surprins, pe cît posibil, in vivo şi întrucît modelul se pretează la atari rafinamente, s-au prezentat experimente pe un singur cromozom, cum ar fi sinteza RNA_m (folosit şi ca test de funcţionalitate). S-a urmărit în paralel constituţia zonelor active şi a celor inactive din cromozomi, discutîndu-se pe această bază mecanismul activării în modelul afînării.

Se pun în acest fel, în faţa cititorului, date deosebit de precise şi atractive totodată, pe a căror bază multe din fenomenele diferenţierii celulare devin mai accesibile.

Mihai Zamfir-Grigorescu
Departamentul de biochimie
Bucureşti

Results and problems in Cell Differentiation, Volume 1. *The Stability of the differentiated State* (Rezultate şi probleme ale diferenţierii celulare, vol. 1. Stabilitatea stării diferenţiate), ed. H. Ursprung, Springer-Verlag, Berlin–Heidelberg–New York, 1968, 152 p., 56 fig.

Se urmăreşte, pe baza unei definiţii foarte exacte, răspunsul la întrebarea cum anume se desfăşoară fenomenul diferenţierii celulare şi care este stabilitatea stării rezultate. Pentru aceasta se adoptă o perspectivă biologică adecvată, considerîndu-se cele două direcţii importante ale diferenţierii : ontogenia şi filogenia.

Sînt sugeraţi indicii prin care se poate aprecia diferenţierea celulară, descriindu-se totodată şi cîteva metode pentru analiză, astfel încît tratarea îmbrăţişează şi aspectele cantitative ale diferenţierii. Validitatea concluziilor este garantată şi de marea diversitate a sistemelor în care este studiată diferenţierea. Astfel, sînt discutate condrogeneza, melanogeneza, diferenţierea ţesutului muscular etc. Deosebit de important este însă faptul că descrierea evoluţiei actului biologic al diferenţierii este dublată de o prezentare biochimică atentă, care în multe situaţii se dovedeşte utilă pentru înţelegerea unui fenomen de o asemenea complexitate.

Este de asemeni trecută în revistă problema programării — ca mecanism şi localizare — a fenomenului diferenţierii. Dar volumul aduce contribuţii analitice şi teoretice şi în alte domenii înrudite, care nu constituie subiectul propriu zis al său, cum ar fi de exemplu problema atît de actuală a tumorilor.

Mihai Zamfir-Grigorescu
Departamentul de biochimie
Bucureşti

Evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man. vol. 3: *Certain polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic compounds.* (Evaluarea riscurilor de cancerizare prezentate de unele chimicale pentru om; vol. 3: Unele hidrocarburi aromatice policiclice şi compuşi heterociclici). International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, 1973, 271 pag.

Acest volum al monografiei este consacrat unui număr de hidrocarburi aromatice policiclice (HAP) şi de compuşi heterociclici care s-au selecţionat pe baza unor date experimentale ce au demonstrat carcinogenitatea lor pentru animale.

Studiile epidemiologice care au atras atenţia asupra acestei clase au fost efectuate în condiţii de mediu în care aceşti produşi se întîlnesc mai curînd ca amestecuri decît ca substanţe pure. Grupul de specialişti IARC însărcinat cu standardizarea metodelor pentru determinarea HAP în aer a decis că investigarea trebuie să privească următoarele substanţe: benz (a) pirenul, benz (e) pirenul, benz (k) florantenul, benz (g, h, i) perilenul, coronenul şi benz (a) antracenul. În prezent există metode simple şi reproductibile pentru detectarea şi determinarea cantitativă a acestor derivaţi în mediul ambiant şi în probe biologice. În general, metodologia pentru determinarea urmelor de HAP din mediu poate fi divizată în a) luare de probe, b) separare, c) purificare şi concentrare şi d) determinare. Determinările în aerul atmosferic se fac în condiţii speciale în funcţie de sezon, de densitatea traficului, de nivelul general de poluare, cu utilizarea unor metodologii şi tehnici diferite de luare a probelor, etc.

Monografia cuprinde date despre aspecte clinice, experimentale şi despre compoziţia chimică a funinginei, negrului de fum, gudroanelor de cărbune, smoalei, uleiurilor minerale. De asemenea se discută rolul HAP şi al compuşilor heterociclici în expunerea neprofesională la aceşti agenţi. Se prezintă constante fizice şi chimice, metode de analiză, răspîndirea, date biologice şi bibliografice pentru 13 HAP şi 4 compuşi heterociclici.

Volumul conţine un index cumulativ pentru monografiile anterioare din această serie.

Gabriela Romalo

Institutul oncologic Bucureşti

Optimierung der diagnostik (Optimizarea diagnosticului), ed. H. Lang, W. Rick, L. Róka, Springer-Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1973, 275 pag.

Volumul cuprinde lucrările Societăţii Germane de Chimie Clinică, prezentate în cadrul unui simpozion Merck, la Mainz, în ianuarie 1973. Scopul acestui simpozion a fost realizarea unei mai bune utilizări a rezultatelor de laborator pentru întreaga activitate medicală, adică pentru profilaxie, terapie şi recuperare; cu alte cuvinte, rezultatul să nu indice numai tipul de maladie, ci să servească şi drept plan de tratament. După cum a arătat L. Róka, preşedintele simposionului, chimia clinică oferă în prezent mai mult informaţii fenomenologice, şi nu informaţii despre procesul patologic care stă la baza fenomenului. Actualele date de laborator nu aduc întotdeauna ceea ce ar trebui să ştie medicul pentru a ajuta pacientul; ele trebuie interpretate,

decodate, aranjate fiziopatologic şi chimiopatologic, pentru a căpăta o semnificaţie clinică.

Subiectele discutate în cadrul simpozionului s-au axat pe acest punct de vedere. Astfel, s-a discutat modul de îmbunătăţire a contribuţiei chimiei clinice pentru diagnostic, alegerea spectrului de analize în funcţie de o serie de date clinice precise, premize pentru obţinerea unor date de laborator reproductibile. O atenţie deosebită s-a acordat criteriilor de ameliorare a interpretării rezultatelor; s-au analizat: specificitatea metodelor de analiză, semnificaţia diagnostică a determinării activităţilor enzimatice, precizarea domeniilor de valori normale, valoarea pronostică a modelelor de laborator.

Volumul este extrem de util atît chimiştilor din laboratoarele clinice cît şi clinicienilor. Discutarea posibilităţilor de a optimiza diagnosticul prin evaluarea unor modele noi oferă perspectiva de a se ajunge la o medicină mai bună.

Gabriela Romalo
Institutul oncologic Bucureşti

Pathology of tumours in laboratory animals, vol. 1, *Tumours of the rat* (Patologia tumorilor la animale de laborator, vol. 1, Tumorile şobolanului), editor V. S. Turusov, International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, 1973, partea I, 201 pag.

Necesitatea de a avea o terminologie standardizată în domeniul patologiei, în vederea facilitării unor studii comparative în diferite regiuni geografice, a preocupat în ultima vreme tot mai mult pe specialişti; din această cauză, OMS a hotărît publicarea unei serii de monografii despre standardizarea clasificării histologice a tumorilor animalelor de laborator. O astfel de standardizare este deosebit de utilă deoarece testarea carcinogeneicităţii se face pe baza tumorilor apărute la animalele de experienţă şi este cu atît mai importantă, cu cît în prezent studiul carcinogenezei tinde să devină parte integrantă a studiilor referitoare la toxicitatea pe termen lung.

La alcătuirea monografiei de faţă (prima din serie) au participat 11 specialişti din diferite ţări şi laboratoare; Volumul conţine o analiză a tumorilor de piele şi a glandelor sebacee din canalul auditiv extern, a tumorilor glandei mamare şi glandelor salivare, a tumorilor tubului digestiv (esofag, stomac, intestin şi pancreas), a tumorilor ţesuturilor moi şi ţesutului osos, de asemenea ale sistemului hematopoetic.

În general, diferiţii autori au adoptat o schemă comună de prezentare şi anume: structura normală a organului respectiv, morfologia şi clasificarea tumorilor, tumorile spontane, principalele metode de inducere a tumorilor şi aspecte comparative. Accentul s-a pus în special pe descrierea morfologică şi clasificarea tumorilor. S-a încercat, acolo unde acest lucru a fost posibil, să se adopte clasificarea şi terminologia propusă de OMS pentru tumorile umane.

Monografia se adresează îndeosebi specialiştilor în anatomie patologică experimentală, dar este interesantă pentru toţi oncologii.

Gabriela Romalo
Institutul oncologic Bucureşti

„Studii şi cercetări de biochimie" publică articole originale, de nivel ştiinţific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici ca : Viaţa ştiinţifică, în care prin note scurte sînt aduse la cunoştinţa cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei : congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experienţă între cercetătorii români şi cei străini etc., Recenzii — în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în ţară şi peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugaţi să înainteze articolele, notele şi recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuş, pe hîrtie de calc. Tabelele şi ilustraţiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planşe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea aceloraşi date în text, tabele şi grafice. Explicaţia figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de iniţiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanţelor internaţionale.

Autorii au dreptul la un număr de 50 de extrase, gratuit.

Responsabilitatea asupra conţinutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondenţa privind manuscrisele, schimbul de publicaţii etc., se va trimite pe adresa Comitetului de redacţie : str. Docenţilor nr. 20, Bucureşti 2, Sectorul I.

Results and Problems in cell differentiation, Volume 3. *Nucleig acid hybridization in the study of cell differentiation* (Rezultate şi probleme ale diferenţierii celulare, vol. 3. Hibridizarea acizilor nucleici în studiul diferenţierii celulare), ed. H. Ursprung, Springer-Verlag Berlin—Heidelberg—New York, 1972, 75 p., 29 fig.

În acest volum se face o trecere în revistă, critică, a literaturii ultimilor ani în materie de hibridizare a acizilor nucleici. Fenomenul este privit din punct de vedere teoretic, al semnificaţiei sale pentru viaţă, al relaţiilor sale cu fenomenele fizice prin care se realizează şi al posibilităţilor metodologice. Lucrarea tinde să răspundă unor întrebări legate de diferenţierea celulară, cum ar fi : localizarea genelor pe cromozomi, izolarea pe scară preparativă a genelor şi testarea lor metabolică, heterogenitatea genică, stabilirea părţii de genom transcriptibilă în fiecare celulă, localizarea programului acestei transcrieri etc. Materialul este structurat în 6 capitole a căror enumerare este, prin ea însăşi, o dovadă a felului judicios în care a fost tratat subiectul. În ordine, capitolele sînt :

— Problema identităţii genetice a diferitelor tipuri de celule.

— Specificitatea tisulară a transcripţiei genetice.

— Analize cinetice ale heterogenităţii secvenţelor de baze ale moleculelor de RNA prin hibridizare RNA/DNA.

— Hibridizarea acizilor nucleici cu cromatina izolată.

— Hibridizarea acizilor nucleici cu cromozomii.

— Hibridizarea acizilor nucleici şi natura RNA legat de cromozomi prin proteine.

Deşi monografică prin intenţie şi structură, lucrarea nu este pur şi simplu o enumerare a materialului, ci un tot organic. Ea poate fi consultată cu folos nu numai de către cei care lucrează în domeniu, dar şi de cei care îl abordează prima oară, pentru informare.

Mihai Zamfir-Grigorescu
Departamentul de biochimie
Bucureşti

1974 MAI 29

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

M. ŞERBAN şi D. COTARIU, **Biochimia contracţiei musculare**. 1970, 240 p., 20,50 lei.

L. DICULESCU, DOINA ONICESCU şi LETIŢIA MISCHIL, **Biologie celulară**. 1971, 420 p., 36 lei.

N. SĂLĂGEANU, **Fotosinteza**, 1972, 243 p., 5 pl., 13 lei.

V. D. MÎRZA şi H. ARAŢEI, **Biomorfologia corticalei ovariene la mamifere**, 1972, 180 p., 2 pl., 8 lei.

P. RAICU, M. IONESCU-VARO, G. GANCEVICI şi GABRIELA MOISESCU, **Celula. Structură, ultrastructură şi funcţii**. 1972, 344 p., 12 pl., 26 lei.

EUGEN MACOVSCHI, **Natura şi structura materiei vii**, 1972, 184 p., 4 pl., 15 lei.

I. V. DEACIUC, **Reglarea celulară a metabolismului glucozei şi acizilor graşi**, 1973, 255 p., 10,50 lei.

La revue „Studii şi cercetări de biochimie" parait 4 fois par an. Le prix d'un abonnement annuel est de $ 5—. Toute commande à l'étranger sera adressée à Întreprinderea Rompresfilatelia, Boîte Postale 2001, telex 011631, Bucarest, Roumanie, ou à ses représentants à l'étranger. En Roumanie, vous pourrez vous abonner par les bureaux de poste ou chez votre facteur.

ST. CERC. BIOCHIM., TOMUL 17, NR. 2, P. 119—236, BUCUREŞTI, IUNIE, 1974

I. P. „Informaţia" — c. 1165

43816

Lei 20.—

F 1330

studii şi cercetări de biochimie

3

TOMUL 17

1974

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

St. cerc. biochim., tomul 17, nr. 3, p. 237—318, Bucureşti, August, 1974

SCBIAS — 17 (3), 237 — 318 (1974)

COMITETUL DE REDACȚIE

Redactor responsabil:

Academician E. MACOVSCHI

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUȘANSCHI

Membri:

S. OERIU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei Republicii Socialiste România; M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; TR. RĂDULESCU; VICTORIA ALEXANDRESCU

Secretar de redacție:

VICTOR GHEȚIE

Revista apare de 4 ori pe an.

Prețul unui abonament anual este de 80 lei.

În țară abonamentele se fac la oficiile poștale, agențiile poștale, factorii poștali și difuzorii voluntari din întreprinderi și instituții. Revista se poate procura (direct sau prin poștă) și prin PUNCTUL DE DESFACERE din cadrul Editurii Academiei.

Orice comandă din străinătate (numere izolate sau abonamente) se face prin Întreprinderea Rompresfilatelia, Căsuța poștală 2001 — telex 011631, București, România, sau prin reprezentanții săi din străinătate.

Manualele, cărțile și revistele pentru schimb, precum și orice corespondență, se vor trimite pe adresa Comitetului de redacție al revistei „Studii și cercetări de biochimie": București, str. Docenților, nr. 20, sectorul 1.

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA
București, str. GUTENBERG nr. 3 bis, sectorul 6

STUDII ŞI CERCETĂRI DE
B I O C H I M I E

Tomul 17, nr. 3 1974

SUMAR

L. BUZILĂ, C. MOTAŞ, Reducerea enzimatică a imunoglobulinelor *A* polimere 239
M. CÂRSTEANU, Proteinele solubile şi solubilizate din stratul cornos exfoliat al leziunilor de psoriazis 247
D. CRIŞAN, ŞT. MARCOVSKI, S. COMOROŞAN, Efectul iradierii benzilpenicilinei asupra activităţii penicilinazice 253
V. JURCĂ, Electroforeza hemoglobinei unor specii şi linii de ciprinide în gel de poliacrilamidă 259
E. NICOARĂ, D. OŞIANU, B. DEMKÓ, Eficienţa carotenoidelor din făina de măceşe asupra pigmentaţiei gălbenuşului de ou 265
TH. PÎRVU şi I. BRAD, Zaharurile solubile din sămînţa diferitelor specii de grîu din seria poliploidă a genului *Triticum* 271
A. POPESCU, G. DINESCU, Aparat de microelectroforeză celulară 279
D. POPOV, Separarea cromatografică şi caracterizarea electroforetică, cinetică şi imunochimică a fosfatazei acide din seminţele de porumb germinate 287
GH. SĂLĂJAN, O. POPA, V. TĂMAŞ, V. DANKANITS, D. JOCA, Testarea valorii biologice a fosfatului dicalcic pe şobolani 297
M. SERBAN, FL. IONESCU-STOIAN, Comparaţie între două metode de dozare a glucozei sanguine 303
H. D. SCHELL, M. A. MATEESCU, Legarea covalentă a peroxidazei de CH- şi AH-Sepharose 4 B 307

RECENZII 313

STUDII ŞI CERCETĂR DE

B I O C H I M I E

Tome 17, no. 3 1974

CONTENTS

I. BUZILĂ, C. MOTAŞ, Enzymatic reduction of immunoglobulin A polymer 239
M. CÂRSTEANU, The soluble and solubilized proteins from the cornified layer of psoriatic lesions 247
D. CRIŞAN, ST. MARCOVSKI, S. COMOROŞAN, Effect of benzilpenicillin irradiation on penicillinase activity 253
V. JURCA, Electrophoresis in polyacrylamide gels of hemoglobin in some species and lines of cyprinidaes 259
E. NICOARĂ, D. OŞIANU, B. DEMKÓ, Efficiency of rose hip-meal carotenoids upon the yolk pigmentation 265
TH. PÎRVU, I. BRAD, Soluble sugar in the seeds of various species in the polyploid series of the genus *Triticum* 271
A. POPESCU, G. DINESCU, Cellular microelectrophoresis apparatus 279
D. POPOV, Chromatographic separation and electrophoretic, kinetic and immunochemical characterization of the maize germinated seeds acid phosphatase 287
GH. SĂLĂJAN, O. POPA, V. TAMAŞ, V. DANKANITS, D. JOCA, Testing of biological value of dicalcium phosphate on rats 297
M. ŞERBAN, FL. IONESCU-STOIAN, Comparison between two methods of blood glucose determination 303
H. D. SCHELL, M. A. MATEESCU, Covalent binding of peroxidase on CH- and AH-Sepharose 4 B 307

BOOK REVIEW 313

ST. CERC. BIOCHIM., 17, 3, 239–245, 1974

REDUCEREA ENZIMATICĂ A IMUNOGLOBULINELOR A POLIMERE

LUCIA BUZILĂ şi CECILIA MOTAŞ

Rezumat. — S-a urmărit reducerea moleculelor de IgA polimere cu ajutorul protein-reductazei NADPH-dependente. După reducere, prin electroforeză în disc în poliacrilamidă în mediu alcalin cu uree, pe lîngă formele polimerizate rămase nereduse s-a observat apariţia unor forme monomere cu migrare electroforetică mai rapidă. Prin cromatografia în gel de Sephadex G-100 în acid acetic N + uree 6 M a preparatului redus s-a evidenţiat o cantitate apreciabilă de peptide dializabile cu greutăţi moleculare mici care provin din fragmentele Fc. Aceasta arată că un proces de hidroliză este asociat procesului de reducere enzimatică. Se discută deosebirea între reducerea enzimatică şi cea chimică.

Studiul degradării imunoglobulinelor A secretoare cu enzime proteolitice a dat rezultate care în majoritate confirmă rolul piesei secretoare (SC) în rezistenţa moleculei faţă de acţiunea enzimatică (1), (2), (3). În ceea ce priveşte acţiunea agenţilor reducători, în general s-a adoptat ideea că IgA secretoare este rezistentă la acţiunea lor (4). Brandtzaeg însă, reuşeşte în condiţii blînde de reducere, ca întrebuinţarea a 0,015 M β-mercaptoetanol sau a 0,06 M cisteină să reducă molecula de IgA secretoare eliberînd SC (5). În ceea ce priveşte eliberarea fracţiunilor 7S IgA rezultatele sînt mai puţin concludente variind cu concentraţia reducătorului şi cu metoda întrebuinţată pentru determinare (5). Se pare deci că şi dimerizarea este un mijloc prin care molecula de IgA rezistă la acţiunea agenţilor reducători sau proteolitici. Odată cu evidenţierea lanţului de legătură J în molecula imunoglobulinelor polimere (6), (7) s-a ridicat întrebarea dacă prezenţa lui nu conferă această rezistenţă (3), (8).

În aceste condiţii se impuneau studii de reducere a IgA serice polimere lipsite de piesa secretoare.

Implicarea dimerizării şi a lanţului J în rezistenţa moleculei IgA secretoare a condus la studierea susceptibilităţii IgA dimere de mielom. Experienţele au arătat că aceste molecule sînt susceptibile la acţiunea enzimelor proteolitice (9), deci se părea că lanţul J nu este implicat în această rezistenţă. Rezultatele lui Seligmann şi colab. (10) care arată că polimerii de lanţ α sînt mai rezistenţi la digestia cu papaină decît IgA serică, monomer, infirmă afirmaţia de mai sus.

Neconcordanţa rezultatelor cu enzime proteolitice a pus problema rezistenţei moleculei IgA dimere la acţiunea agenţilor reducători. Aceasta, cu atît mai mult cu cît legarea lanţului J de jumătăţile aminoterminale ale fragmentului Fc al imunoglobulinelor se face prin multiple legături disulfidice (11), (12).

Luînd în considerare eterogenitatea accentuată a polimerilor IgA din serul normal şi din serul mielomatos, remarcată de mulţi cercetători (13) se mai pune întrebarea dacă toate tipurile sînt formate prin lanţul J (14) sau unele din ele, doar prin legături disulfidice interlan-

ţuri H. În favoarea acestei presupuneri vin determinările lui J. P. Vaerman şi colab. (15) care arată că pentru desfacerea subunităţilor polimerilor de IgA este necesară şi suficientă o reducere şi alchilare blîndă, forţele necovalente nefiind implicate în unirea lor. Problema se complică însă din nou odată cu indicaţia posibilităţii de eliberare a lanţului J în condiţii asemănătoare celor indicate de Vaerman (16), (17).

În această situaţie era deosebit de interesant să se studieze posibilitatea reducerii pe cale enzimatică a moleculei IgA polimere, cale extrem de blîndă şi prin care s-a putut obţine reducerea piesei secretoare din molecula IgA secretoare (18). În lucrarea amintită nu s-a putut dovedi reducerea IgA dimere, ci doar deplierea lor, consecutivă reducerii SC din moleculă.

Rezultatele lucrării de faţă confirmă posibilitatea reducerii unei proporţii a populaţiei moleculelor polimere de IgA prin protein-reductaza NADPH-dependentă, ducînd la apariţia unor forme monomere odată cu menţinerea şi a unor forme polimerizate. Totodată are loc un proces concomitent de hidroliză cu distrugerea fragmentului Fc pînă la peptide.

MATERIAL ŞI METODE

Pentru separarea IgA mielom a fost folosit serul sanguin obţinut de la Spitalul „Dr. I. Cantacuzino" prin bunăvoinţa dr. N. Luca.

Prezenţa IgA mielom s-a demonstrat prin imunoelectroforeză (19) utilizînd seruri de iepure anti IgA precum şi anticolostru uman.

Prepararea antiserurilor s-a făcut pe iepuri utilizînd cîte 1 mg IgA per injecţie, în asociaţie cu adjuvant Freund. S-au făcut 2—3 injecţii la interval de 14 zile fiecare.

Electroforeza preparativă din ser a fost făcută în gel de 1% agaroză cu o grosime de strat de 3—4 mm, în tampon veronal—veronal sodic, pH 8,6 u = 0,05. La 1 mA/cm, la 200 V, timpul de migrare a variat între 4 şi 5 ore. După electroforeză localizarea imunoglobulinelor A s-a determinat prin colorarea imediată a unei replici pe hîrtie. Gelul corespunzător s-a secţionat pe o lăţime de 1—2,2 cm deasupra startului (fracţiunea I) precum şi sub start (fracţiunea II). Fiecare fracţiune în parte a fost omogenizată cu 1 ml ser fiziologic. După 3 îngheţări-dezgheţări probele au fost centrifugate, iar supernatantele au fost concentrate pentru a fi purificate.

Purificarea preparatelor concentrate s-a făcut prin cromatografie pe o coloană de Sephadex G—200 (100/2,5 cm) în tampon TRIS-HCl, pH 8,0, 0,05 M + NaCl 0,2 M + EDTA 0,002 M.

Verificarea purităţii preparatelor obţinute s-a făcut prin imunoelectroforeză faţă de serurile de iepure anticolostru şi antiser uman total.

Electroforeza în amidon s-a făcut în mediu acid după indicaţiile lui Kunkel (20).

Prepararea disulfid reductazei NADPH-dependente pure a fost făcută după Tietze (21) din ficat de iepure (22); activatorul reacţiei a fost separat după indicaţiile aceluiaşi autor (21).

Reducerea enzimatică a IgA mielom polimer s-a realizat în tampon 0,1 M, TRIS-HCl, pH 7,5 cu 5 μmoli EDTA utilizîndu-se 10 mg IgA

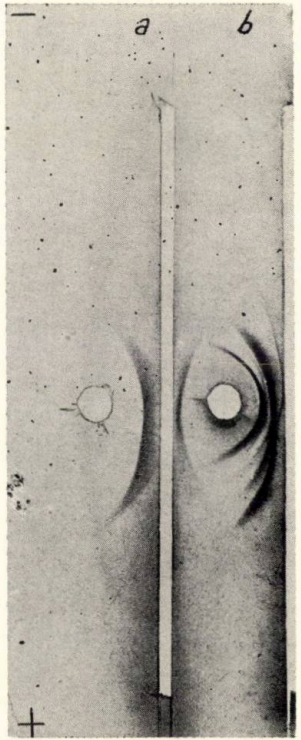


Fig. 1. — Immunoelectroforeza serului mielom.

a) Ser imun anti IgA; *b*) Ser imun antiser sanguin uman total.

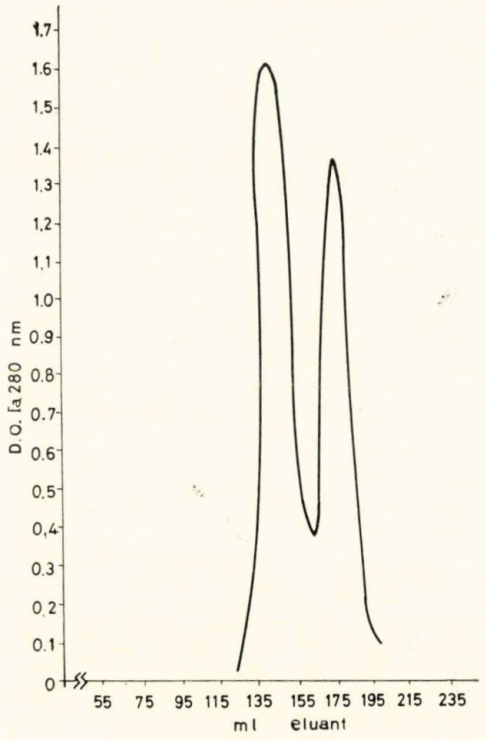


Fig. 2. — Gel filtrarea pe Sephadex G—200 a eluatului concentrat, de la electroforeza preparativă în gel de agaroză.

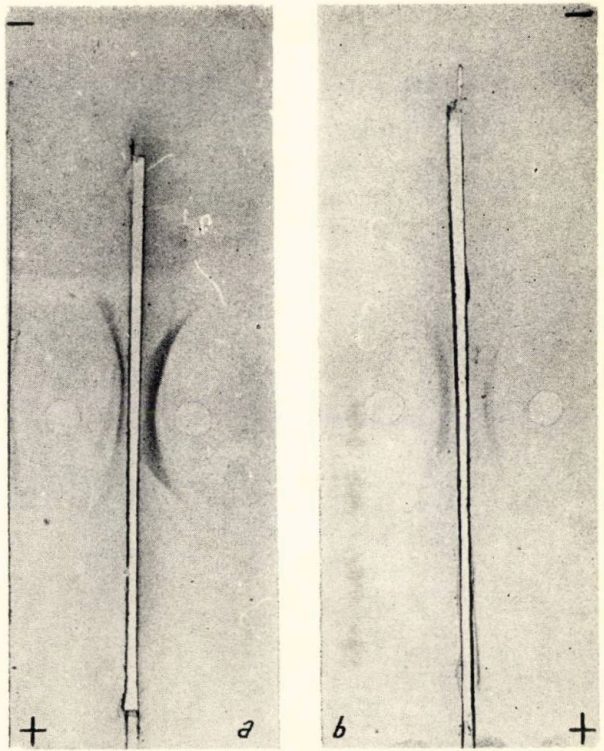


Fig. 3. — Imunoelectroforeza fracțiunilor I și II de la gel filtrarea pe Sephadex G—200 a IgA mielom.

a) Ser imun anticolostru; *b*) Ser imun anti IgA.

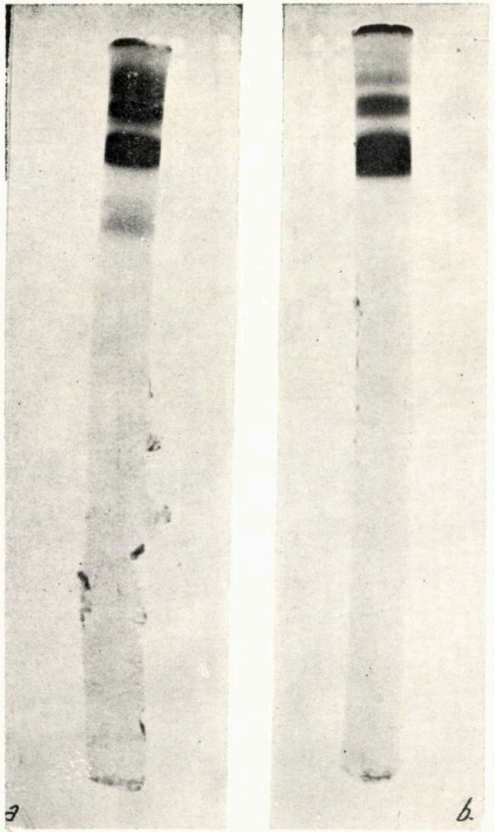


Fig. 4. — Electroforeza în disc la pH alcalin a fracţiunilor I şi II de la gel filtrarea pe Sephadex G—200 a IgA mielom separat prin electroforeză preparativă.

a) Fracţiunea I; *b*) Fracţiunea II.

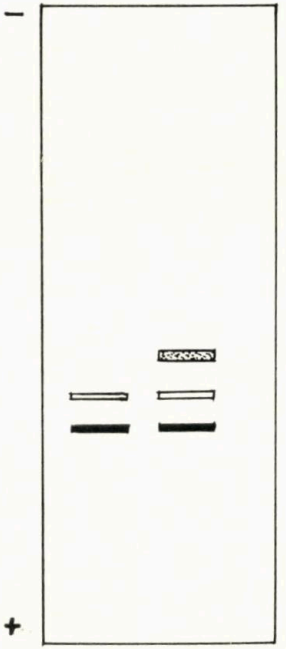


Fig. 5. — Electroforeza în amidon în mediu acid cu uree a fracţiunii I de la gel filtrarea pe Sephadex G—200 a IgA mielom.

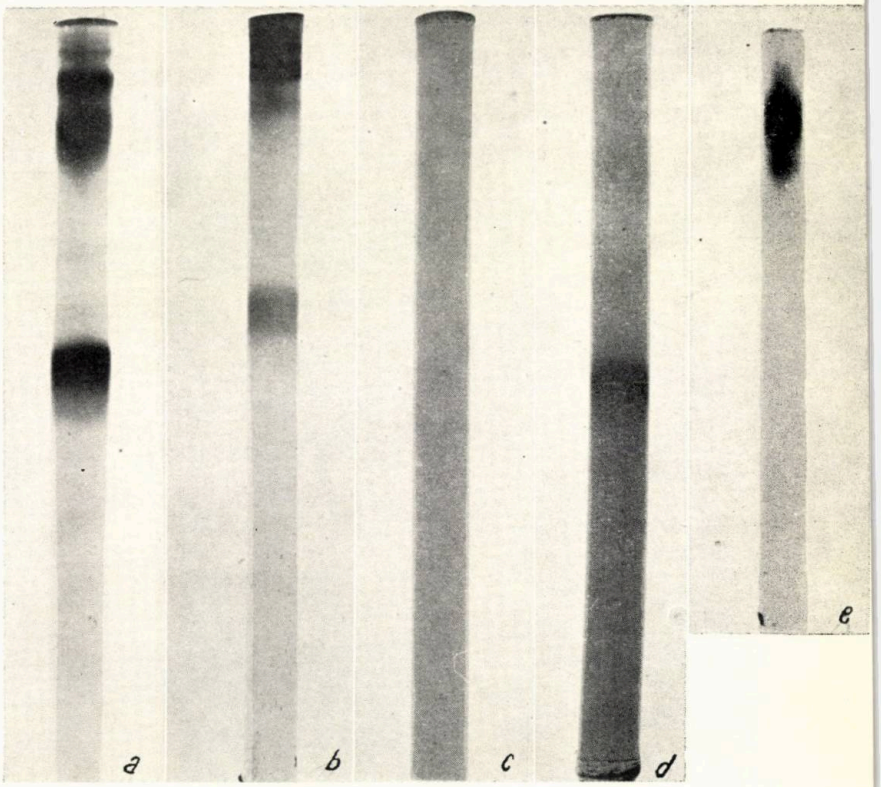


Fig. 6. — Electroforeza în disc în mediu alcalin cu uree.

a) IgA polimer redus enzimatic; *b*) IgA polimer în prezenţa protein-reductazei şi a activatorului, fără NADPH (martor); *c*) Enzima; *d*) Activatorul; *e*) IgA monomer.

Enzima şi activatorul au fost analizate în concentraţiile folosite în probele *a*) şi *b*).

mielom, 0,4—0,6 mg enzimă, 1 mg activator şi 8 mg NADPH la 1 ml (18), timp de 2 ore, la temperatura camerei. Ca martor s-a întrebuinţat o probă în care s-au folosit aceleaşi cantităţi de enzimă şi activator fără NADPH. După reducere probele s-au trecut la cromatografiere fără alchilare, deoarece alchilarea nu este necesară în aceste condiţii (18), asemănător rezultatelor lui Brandtzaeg cu cisteină (5).

Separarea componentelor obţinute după reducerea enzimatică a fost efectuată prin cromatografie pe o coloană de Sephadex G—200, (100/1,2 cm) în acid acetic N, cu uree 6 M. Primul pisc cromatografic obţinut a fost recromatografiat pe o coloană de Sephadex G—100 (100/1,2 cm), folosindu-se acelaşi eluant. Viteza de eluţie a fost de 6—10 ml/oră, fracţiunile culese fiind de 2 ml.

Electroforeza în disc de poliacrilamidă a preparatului redus a fost efectuată în tampon glicocol-TRIS, 0,035 M, de pH 9,0 cu uree 6 M (23).

REZULTATE

Purificarea IgA polimere. Imunoelectroforeza serului mielom folosit în experienţele noastre dovedeşte că acesta este un mielom de tip IgA (fig. 1).

Fracţiunea aflată imediat sub start izolată din serul de mai sus prin electroforeză preparativă în gel de agaroză a fost cromatografiată pe coloană de Sephadex G—200 pentru purificare (fig. 2). Se remarcă două piscuri cromatografice.

Puritatea IgA în ambele piscuri a fost dovedită prin imunoelectroforeză cu seruri imune anticolostru şi anti IgA mielom (fig. 3).

Cunoscută fiind eterogenitatea populaţiei de IgA polimer, am determinat gradul de polimerizare prin disc electroforeză la pH alcalin. În figura 4, sînt date electroforegramele fracţiunilor obţinute de la gel filtrarea pe Sephadex G—200. Am luat în studiu fracţiunea I (fig. 4a) deoarece rezoluţia prin disc electroforeză este identică cu aceea a IgA secretoare.

Subclasa de IgA a fost determinată chimic prin analiza electroforetică în amidon în mediu acid (20) (fig. 5) constatîndu-se că IgA mielom folosit este de tip IgA_1.

Reducerea enzimatică a IgA polimer a fost urmărită prin :

a) *Electroforeza în disc la pH alcalin cu uree.* După o reducere de două ore atît proba redusă, cît şi martorul se aplică imediat la electroforeză în disc în mediu alcalin cu uree (fig. 6 *a*, *b*, *c*, *d*, *e*).

La proba redusă se observă apariţia în plus a unei fracţiuni cu migrare mai rapidă. Electroforeza unei IgA monomere în aceleaşi condiţii dă rezultate asemănătoare. Am presupus deci că din IgA polimer enzima este capabilă să reducă legăturile —SS— numai la o parte din molecule, lăsînd intactă o populaţie de IgA polimeră. Componentul cu viteză de migrare mare care se observă şi la martor, este activatorul enzimei. Se arată de asemenea migrările electroforetice ale enzimei şi activatorului separat în concentraţiile întrebuinţate la probe.

b) *Cromatografia pe Sephadex G—200 în acid acetic N cu uree 6 M* (fig. 7). Se obţine fracţiunea I care la imunoelectroforeză dă reacţie cu serul imun anti IgA. Fracţiunea II reprezintă în principal NADPH.

Prin cromatografierea probei martor se obține fracțiunea I care suprapusă peste fracțiunea corespunzătoare a probei reduse, arată o mică deplasare a acesteia față de martor. Disc electroforeza în mediu alcalin cu uree a fracțiunilor I de la proba redusă și de la martor confirmă rezultatele din figura 6, care reprezintă rezoluția electroforetică a probei reduse înainte de trecerea pe coloană.

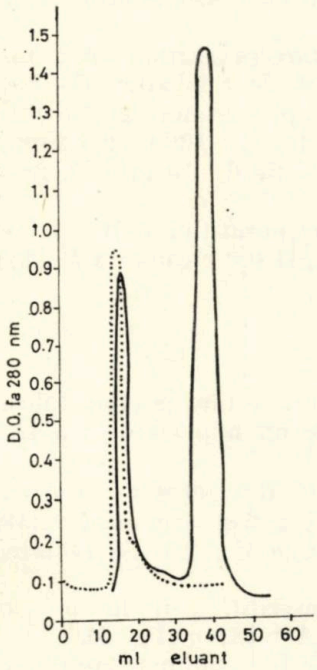


Fig. 7. — Gel filtrarea pe Sephadex G—200 a IgA redus enzimatic (curba continuă) și a martorului (curba punctată).

c) *Recromatografierea pe Sephadex G—100 în acid acetic N cu uree 6 M* a fracțiunii I din figura 7, este redată în figura 8. Fracțiunile I atît de la probă cît și de la martor aproape se suprapun, deplasarea probei reduse fiind extrem de mică. Fracțiunea II care apare după de trei ori void volumul coloanei, reprezintă un material dializabil, deoarece în urma dializei piscul II dispare complet.

Disc electroforeza în mediu alcalin cu uree a fracțiunilor I de la proba redusă și de la martor confirmă rezultatele obținute prin electroforeza probei reduse înainte de trecerea pe coloană (fig. 6).

d) *Exprimarea cantitativă a rezultatelor de la gel filtrarea pe Sephadex G—100* arată că prin procesul de reducere se eliberează și o cantitate apreciabilă de peptide mici (61%) concomitent cu reducerea avînd loc deci și un proces de hidroliză datorat prezenței unor proteaze necunoscute. Un fenomen asemănător este obținut și de alți autori după reducerea

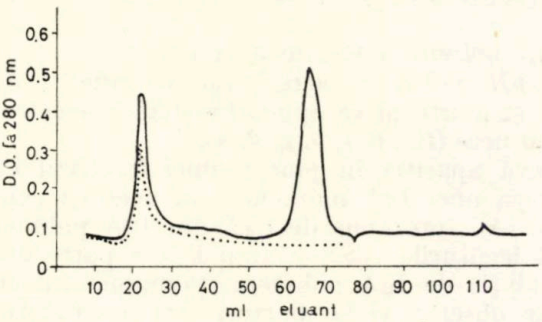


Fig. 8. — Recromatografierea pe Sephadex G—100 a fracțiunii I obținută prin gel filtrarea pe Sephadex G—200 a IgA redus (curba continuă) și a martorului (curba punctată).

imunoglobulinelor A secretoare (24), (25). Deoarece am presupus că polipeptidele ar putea proveni din reducerea enzimatică a activatorului însuși am făcut o altă probă martor compusă din enzimă, activator și NADPH. Rezultatele infirmă presupunerea că polipeptidele ar proveni din activator.

Proteaze capabile de a produce procesul de hidroliză ar putea fi prezente în cazul nostru în activatorul enzimatic. Pentru aceasta am determinat eventuala activitate proteolitică a activatorului pe hemoglobină ca substrat şi am constatat că nu prezintă activitate proteolitică.

DISCUŢII

Rezultatele trebuie discutate sub aspectul eterogenităţii polimerice a IgA. Este cunoscută uşurinţa polimerizării moleculelor de IgA (8) (15) (26) cît şi posibilitatea cuplării altor proteine ca albumina şi tripsina de această imunoglobulină (27) (28). S-a constatat că atît polimerizarea cît şi complexarea cu alte proteine se face prin legături covalente disulfidice. Nefiind implicate şi legături necovalente, reducerea formelor polimerice se face cu uşurinţă (15). Pe de altă parte însă, prezenţa diferitelor forme polimere în serul sanguin normal şi mielomatos este datorită, după Koshland (29) capacităţii de sintetizare intracelulară a formelor polimere care prezintă toate un singur lanţ J per moleculă de polimer, independent de mărimea polimerului. În acelaşi context intră şi sintetizarea în aceeaşi celulă plasmatică a moleculelor de IgA şi a lanţului J, deci sintetizarea în aceeaşi celulă a moleculei dimer de IgA (30).

Reducerea enzimatică practicată de noi pare să fie capabilă să reducă legăturile disulfidice ale unor forme polimere, reuşind să fie aduse la forma de monomer. În aceste condiţii, ar trebui să apară la disc electroforeză în mediu alcalin cu uree, lanţul J (29). Or, noi nu am obţinut această imagine. Este adevărat însă că migrarea activatorului acoperă regiunea unde ar fi trebuit să apară lanţul J. Se mai poate ca formele reduse pînă la monomer să fie în cantitate mică şi deci lanţul J să nu fie sesizabil la separarea în disc.

Mai plauzibil pare însă că, polimerii reduşi enzimatic sînt formaţi numai prin legături disulfidice, ca cele dintre moleculele de IgA şi o altă proteină (27), (28) şi de aceea sînt reduşi de către protein-reductază. În favoarea acestei presupuneri vin cercetările lui Abel (31) care au demonstrat că IgA monomer poate fi polimerizat după ce a fost întîi redus şi apoi reoxidat. Reiese deci că pentru unele forme de polimer nu este nevoie de prezenţa lanţului J.

Rezultatele de la gel filtrarea pe Sephadex G—200 indică prezenţa unui singur pisc care conţine atît formele reduse cît şi formele nereduse, cromatografierea în aceste condiţii nefiind eficientă separării lor. Rezultate asemănătoare s-au obţinut şi la separarea IgA secretoare; produşii monomeri evidenţiaţi prin imunodifuzie radială sau prin imunogelfiltrare radială nu au fost obţinuţi prin gel filtrarea pe Sephadex G—200 (18).

La recromatografierea fracţiunii I pe Sephadex G—100 se obţin două fracţiuni, dar componentele reduse şi nereduse sînt împreună în fracţiunea I, fracţiunea II reprezentînd doar peptide mici. Nici gel filtrarea pe Sephadex G—100 nu reuşeşte să separe formele reduse. Prezenţa formelor reduse în fracţiunile cromatografice s-a dovedit totuşi prin disc electroforeză în mediu alcalin cu uree.

În ceea ce priveşte prezenţa fracţiunii II de la cromatografia pe Sephadex G—100, ea denotă apariţia peptidelor după reducere, fapt oare-

cnm surprinzător. Fracțiunea II nu poate fi atribuită NADPH-ului ca la fracțiunea II de la gel filtrarea pe Sephadex G—200 deoarece, prin separarea de la Sephadex G—200 împreună cu dializa ulterioară se elimină practic tot NADPH-ul. Dealtfel, și după concentrarea și dializa fracțiunii II de la cromatografia pe Sephadex G—200, se evidențiază de asemenea apariția de polipeptide pe lîngă NADPH polipeptide care s-au găsit a avea o greutate moleculară de aproximativ 10 000.

Scindări ale legăturilor peptidice produse de procesul de reducere au mai fost semnalate la IgA și IgM (25), (32), (33), dar cu apariția de fragmente de tip Fab și Fc și nu de peptide mici. Apariția peptidelor confirmă reducerea enzimatică a unei proporții a populației de IgA polimeră, deoarece fragmentul Fc devine susceptibil acțiunii unor proteaze necunoscute în preparatele întrebuințate, (8), (24), (33) fiind hidrolizat pînă la peptide. Are loc un fenomen asemănător hidrolizei cu enzime proteolitice a moleculelor de IgA care produce apariția doar a fragmentelor Fab cu distrugerea integrală a fragmentelor Fc, (1), (2), (3), (8). Structura deosebită a IgA polimere față de aceea a IgM polimere poate explica această comportare (8). Proporția de 61% peptide apărute, indică o cantitate apreciabilă de fragmente Fc hidrolizate. Reiese că, reducerea enzimatică a IgA polimere este diferită de reducerea chimică deoarece nu se obțin fragmente de tip Fab și Fc ca în acest caz (25) (32) (33) ci doar fragmentele Fab.

CONCLUZII

S-a demonstrat reducerea unora din moleculele polimere de IgA_1 mielom prin protein-reductaza NADPH-dependentă. Datorită însă eterogenității formelor polimere și produșii de reacție sînt eterogeni. Se obțin atît forme monomer cît și forme polimer rămase nereduse. Populația redusă pare a fi polimerizată fără intermediul lanțului J. Totodată, are loc un proces concomitent de hidroliză cu apariția de peptide dializabile rezultate din degradarea fragmentului Fc.

Prezentat la redacție la 22 aprilie 1974

Institutul de științe biologice
Departamentul de biochimie București

ENZYMATIC REDUCTION OF IMMUNOGLOBULIN A POLYMER

SUMMARY

The reduction of IgA polymer molecules by NADPH-dependent protein reductase was carried out. After reduction, besides the unreduced polymerized forms, the appearance of some monomeric forms with a faster electrophoretic migration, at disc electrophoresis in alcaline medium with urea was observed. By gel filtration on Sephadex G—200 in acetic acid with 6M urea of the reduced sample, a considerable amount of dialysable

peptides with small molecular weights resulting from Fc fragments was pointed out. This fact evinces that a hydrolytic process is associated to the enzimatic reduction. The difference between enzymatic reduction and the chemical one was suggested.

BIBLIOGRAFIE

1. G. Cederblad, B. G. Johansson, L. Rymo, Acta Chem. Scand., *20*, 2349 (1966).
2. W. R. Brown, R. W. Newcomb, H. Ishizaka, J. Clin. Invest., *49*, 1374 (1970).
3. V. Gheţie, N. St. Chisiu, S. Mihăescu, St. cerc. biochim., *14*, 371 (1971).
4. T. B. Tomasi, J. Bienenstock, Adv. Immunol., *9*, 1 (1968).
5. P. Brandtzaeg, Acta Path. Microb. Scand. Section, B, *79*, 165 (1971).
6. M. S. Halpern, M. E. Koshland, Nature, *228*, 1276 (1970).
7. J. Mestecky, J. Zikan, W. T. Butler, Science, *171*, 1163 (1971).
8. T. B. Tomasi, H. M. Grey, Progr. Allergy, *16*, 81 (1972).
9. T. B. Tomasi, D. C. Czerwinski, în *Immunological deficiency diseases in man, birth defects*. Original articles, series D, vol. 4, Bergsura ed. The National Foundation March of Dimes New York, 1968, p. 274.
10. M. Seligmann, F. Danon, D. Hurez, E. Mihaesco, J. L. Proud'Homme, Science, *162*, 1396 (1968).
11. G. C. Meinke, H. D. Spiegelberf, Fed. Proc., *30*, 468 (1971).
12. J. Mestecky, R. Kulhavy, F. W. Kraus, Fed. Proc., *30*, 468 (1971).
13. J. P. Vaerman – Annales d'Immunologie, *124*, 289 (1973).
14. S. L. Morrison, M. E. Koshland, Proc. Nat. Acad. Sci., *69*, 124 (1972).
15. J. P. Vaerman, H. H. Fudenberg, C. Valrman, W. J. Mandy, Immunochemistry, *2*, 263 (1965).
16. E. Kownatzki, Eur. J. Immunol., *1*, 486 (1971).
17. K. Kobayashi, J. P. Vaerman, J. F. Heremans, Biochem. Biophys. Acta, *303*, 105 (1973)
18. C. Motaş, C. Sarmanioti, Rev. roum. Biochim., *10*, 203 (1973).
19. J. Sheidegger, Int. Arch. Allergy, *7*, 103 (1955).
20. H. M. Grey, C. A. Abel, W. J. Yousil, C. G. Kunkel, J. Exp. Med., *128*, 1223 (1968).
21. F. Tietze, Biochem. Biophys. Acta, *220*, 449 (1970).
22. C. Motaş, C. Sarmanioti, St. cerc. biochim., *16*, 161 (1973).
23. R. A. Reisfeld, P. A. Small, Science, *152*, 1253 (1966).
24. K. Kobayashi, J. P. Vaerman, J. P. Heremans, Immunochemistry, *10*, 73 (1973).
25. V. Yakulis, N. Costea, P. Heller, J. Immunol., *102*, 488 (1969).
26. L. A. Hanson, P. Brandtzaeg, în *Immunologic Disorders in Infants and Children*, ed. B. R. Stiehm, V. A. Fulginiti, W. B. Saunders, Philadelphia, 1972.
27. M. Mannik, J. Immunol., *99*, 899 (1967).
28. Y. Counitchansky, G. Berthillier, R. Got, Clin. Chim. Acta, *30*, 83 (1970).
29. E. C. Wilde, M. E. Koshland, Biochemistry, *12*, 3218 (1972).
30. A. R. Lawton, R. Asofsky, R. G. Mage, J. Immunol., *104*, 307 (1970).
31. C. A. Abel, H. M. Grey, Biochemistry, *7*, 2682 (1968).
32. W. L. Albritton, R. E. Schrohenloher, J. C. Bennett, J. Immunol., *104*, 518 (1970).
33. J. E. Morris, F. P. Inman, J. Immunol., *105*, 451 (1970).

ST. CERC. BIOCHIM., 17, 3, 247–251 (1974)

PROTEINELE SOLUBILE ŞI SOLUBILIZATE DIN STRATUL CORNOS EXFOLIAT AL LEZIUNILOR DE PSORIAZIS

MIOARA CÂRSTEANU

Rezumat — Proteinele solubilizate cu hidroxid de sodiu din stratul cornos exfoliat al leziunilor de psoriazis se deosebesc de proteinele solubile extrase în tampon fosfat, prin cantitatea mare de cisteină şi histidină pe care o conţin. Acest fapt aruncă o nouă lumină asupra procesului de biosinteză proteică în cazul în speţă, deoarece keratohialina, care în mod normal conţine mari cantităţi de cistină şi histidină, lipseşte din epidermul psoriaticilor.

Cercetările efectuate în legătură cu biosinteza proteinelor din epiderm sugerează existenţa la acest nivel a unei proteine majore; procesul de keratinizare ar avea loc concomitent cu adiţia la această proteină a diferite fragmente peptidice nou sintetizate (1) (2). Aceasta înseamnă că stadiul final al keratinizării poate fi caracterizat printr-o polimerizare complexă, alături de o deshidratare celulară. Or, formarea stratului cornos într-o leziune de psoriazis este incompletă, cu toate că epidermul sintetizează o cantitate mult mai mare de proteine decît în cazurile normale.

Cu toate că multe studii îndreptate în acest sens au încercat să elucideze în ce constă viciul metabolic la nivelul epidermului în cazurile de psoriazis, caracterizat prin apariţia unei parakeratoze, rezultatele obţinute sînt împărţite şi neconcludente.

Cercetări anterioare (3), în care s-a studiat exosmoza peptidelor din epidermul uman normal şi al leziunilor de psoriazis, au condus la ideea posibilităţii unor modificări în aceste cazuri, ale metabolismului proteic din epiderm, ce ar putea surveni la momentul încorporării acestor peptide în molecula proteică. De aceea, am considerat utilă continuarea cercetărilor, prin determinarea proteinelor şi, respectiv, a aminoacizilor care le compun, în stratul cornos exfoliat al leziunilor de psoriazis, în speranţa că lucrarea de faţă va veni în sprijinul elucidării acestor probleme.

MATERIAL ŞI METODE

Extracţia proteinelor solubile din stratul cornos s-a realizat în felul următor: 3 g ţesut cornos izolat din leziunile bolnavilor de psoriazis se mojarează cu nisip de cuarţ şi se tratează cu tampon fosfat pH 7,3, 0,01 M, în raport de 1 ml soluţie tampon/1 g ţesut (4). După 2 ore de extracţie la 4°C, în frigider, se centrifughează omogenatul timp de 30 min, la 12 000 g, la o centrifugă cu răcire tip K14 (H. Janetzky). Supernatantul se foloseşte la analiza cromatografică.

Extragerea proteinelor solubilizate: din reziduul rămas se extrag proteinele insolubile în soluţii tampon la pH neutru prin solubilizare în NaOH 0,05 N (5) (6), în aceleaşi proporţii şi condiţii ca în cazul extragerii proteinelor solubile cu tampon fosfat.

Pentru îndepărtarea aminoacizilor liberi, supernatantul se trece pe o coloană de Zerolit 225 (SRC 10) 4—5% DVB, 52—100 mesh, 0,9 × 10 cm.

Cromatografia în coloană. S-au folosit coloane de 60 × 1,6 cm, încărcate cu Sephadex G—100. Cantitatea de extract aplicată a fost de 2,5 ml., cu un conţinut proteic de aprox. 5—6 mg. Eluţia s-a realizat cu tampon fosfat pH 7,2 respectiv cu NaOH 0,05N, cu un debit de 20 ml/oră. Concentraţia proteinelor în fracţiunile cromatografice culese cu ajutorul unui colector automat de fracţiuni LKB a fost determinată prin spectrofotometrare la 280 nm, la un spectrofotometru Zeiss, tip VSU 2.

Cromatografia pe hîrtie a aminoacizilor. Fracţiunile proteice obţinute la trecerea pe coloana de Sephadex au fost hidrolizate prin fierbere cu acid clorhidric 20%, timp de 48 ore. Fiecare hidrolizat a fost evaporat la sec, pe baie de apă, iar reziduul din capsulă a fost reluat cu 0,20 ml izopropanol 10%, din care s-au aplicat probe de 50 µl pe hîrtie Whatman nr. 1. Lichidul de irigare folosit a fost format din butanol : apă : acid acetic (11 : 11 : 3 v/v). Spoturile au fost puse în evidenţă prin pulverizare cu o soluţie de ninhidrină 0,3% în etanol, iar dezvoltarea culorii s-a produs la temperatura camerei şi la întuneric. După 48 ore de la pulverizarea cu ninhidrină, spoturile individuale ale aminoacizilor s-au decupat în eprubete. Prin umectarea lor cu o soluţie de clorură de cadmiu şi ninhidrină în acetonă, aminoacizii au fost transformaţi într-un complex cu cadmiu, care ulterior a fost eluat cu 3 ml metanol. Probele au fost fotometrate la 530 nm.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Din analiza diagramelor de eluţie obţinute în cazul cromatografierii extractului proteic în tampon fosfat se constată o singură fracţiune majoră, net delimitată, şi o a doua fracţiune schiţată sub forma unui umăr la nivelul primei (fig. 1). În schimb, extractul proteinelor solubilizate cu NaOH conduce, prin eluţie, la diagrame în componenţa cărora intră două fracţiuni majore şi o a treia fracţiune în care sînt schiţaţi trei umeri (fig. 2).

În ceea ce priveşte analiza cromatografică a aminoacizilor componenţi ai acestor fracţiuni, se constată că fracţiunea majoră a proteinelor solubile este constituită din acid aspartic, acid glutamic, glicocol, prolină, lizină şi tirozină (tabela 1).

Prima fracţiune a proteinelor solubilizate cu NaOH este alcătuită din cisteină, histidină, acid aspartic şi acid glutamic; cea de-a doua fracţiune conţine cisteină, histidină şi lizină iar grupa a treia de fracţiuni, abia schiţată, conţine treonină şi prolină. Cu toate că aceste fracţiuni proteice nu conţin aminoacizi cu nucleu tirozinic, ele prezintă totuşi o absorbţie la 280 nm datorită probabil fie histidinei, fie poate unor nuclee aromatice rezultate

din descompunerea triptofanului, fie chiar glucidelor provenite din descompunerea glicogenului sau glicoproteinelor.

De remarcat este cantitatea mare de cisteină şi histidină conţinută în proteinele insolubile la pH neutru, din stratul cornos descuamat al leziunilor de psoriazis. Se ştie că legăturile disulfidice reprezintă una din caracteristicile majore ale stratului cornos normal (7). Flesh şi colab. (8) menţionează că prezenţa grupărilor sulfhidril constituie una din caracteristici în anomalia procesului de keratinizare în psoriazis.

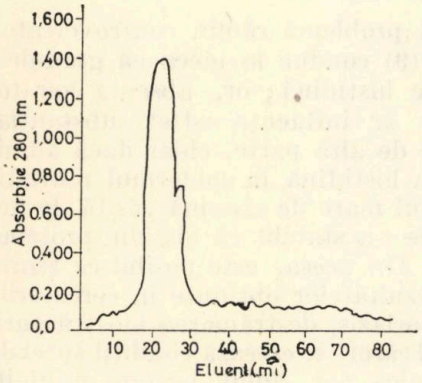


Figura 1. — Cromatograma extractului proteic în tampon fosfat.

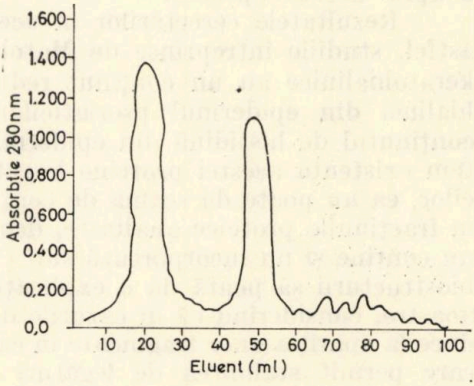


Figura 2. — Cromatograma proteinelor solubilizate cu NaOH.

Matoltsy şi Matoltsy (9) au arătat, în cercetări recente privitoare la aminoacizii conţinuţi în granulele keratohialinice, preponderenţa cistinei şi prolinei. Or, este cunoscut faptul că în epidermul psoriaticilor keratohialina este absentă, astfel că pe această cale nu se poate explica cantitatea mare de cisteină din extractele noastre (10).

Tabela 1

Compoziţia în aminoacizi a proteinelor extrase din stratul cornos descuamat al leziunilor de psoriazis (nm/g ţesut cornos)

Aminoacizi	Proteine solubile	Proteine solubilizate		
	Fracţiunea 1	Fracţiunea 1	Fracţiunea 2	Fracţiunea 3
Acid aspartic	0,480	0,070	—	—
Acid glutamic	0,380	0,110	—	—
Glicocol	0,180	—	—	—
Lizină	0,140	—	0,100	—
Prolină	0,120	—	—	0,180
Tirozină	0,100	—	—	—
Cisteină	—	0,740	0,580	—
Histidină	—	0,480	0,420	—
Treonină	—	—	—	0,210

O serie de autori (11) au izolat din epidermul normal o proteină cu un conţinut neobişnuit de mare de histidină. Fukuyama şi Epstein (12) au sugerat, în baza unor studii cinetice, că această histidin-proteină este sintetizată în citoplasma celulelor granuloase, iar apoi se asociază materialului keratohialinic, care în epidermul normal reprezintă materialul de start în procesul de keratinizare. Ţinînd seama de faptul că această proteină nu a putut fi izolată din epidermul psoriaticilor, unde keratohialina este absentă (10), determinarea în lucrarea de faţă a unei proteine bogată în histidină din scoamele leziunilor de psoriazis, ar arunca o nouă lumină asupra acestui proces.

Rezultatele cercetărilor în această problemă rămîn controversate : astfel, studiile întreprinse de Matoltsy (9) conduc la ideea că granulele keratohialinice au un conţinut redus de histidină ; or, absenţa keratohialinei din epidermul psoriaticilor nu ar influenţa astfel substanţial conţinutul de histidină din epiderm. Pe de altă parte, chiar dacă admitem existenţa acestei proteine bogată în histidină în epidermul psoriaticilor, ea nu poate da seama de conţinutul mare de cisteină găsită de noi în fracţiunile proteice analizate, deoarece s-a stabilit că histidin-proteina nu conţine şi nu încorporează sulf (13). De aceea, este posibil ca teoria biostructurii să poată da o explicaţie rezultatelor obţinute în cercetările noastre, considerînd că în cazurile de psoriazis, destrămarea biostructurii duce la apariţia unor fragmente în cadrul cărora se creează condiţii speciale care permit stabilirea de legături chimice noi, luînd naştere anumiţi compuşi care nu preexistau sub formă de componente în biostructura iniţială.

În concluzie se poate spune că proteinele solubilizate cu hidroxid de sodiu din stratul cornos exfoliat al leziunilor de psoriazis se deosebesc de proteinele solubile extrase în tampon fosfat, prin cantitatea mare de cisteină şi histidină pe care o conţin. Acest fapt sugerează ideea unor modificări în biosinteza proteică în cazurile de psoriazis, deoarece keratohialina care în mod normal conţine mari cantităţi de cistină şi histidină, lipseşte din epidermul psoriaticilor.

Prezentat la redacţie la 27 martie 1974

Centrul de biostructură
Bucureşti

THE SOLUBLE AND SOLUBILIZED PROTEINS FROM THE CORNIFIED LAYER OF PSORIATIC LESIONS

SUMMARY

The author shows that the solubilized proteins with natrium hydroxide from the cornified layer of psoriatic lesions differ from the soluble proteins extracted with phosphate buffer, on account of the great quantities of cysteine and histidine. This fact suggests new ideas about the biosynthesis of proteins in this disease since keratohyaline, that contains great quantities of cysteine and histidine, is not found in psoriatic epidermis.

BIBLIOGRAFIE

1. W. Montagna, W. C. Lobitz, *The epidermis*, Acad. Press, New York, London, 1964, p. 354.
2. S. Rothberg, J. Invest. Derm., **3**, 149, 151 (1964).
3. Mioara Cârsteanu, R. Dumitriu, Rev. roum. Biochim., **9**, 201 (1972).
4. S. Rotberg, J. Invest. Derm., **43**, 151 (1964).
5. W. Montagna, W. C. Lobitz, *The epidermis*, Acad. Press, New York, London, 1964, p. 352.
6. S. Rotberg, J. Invest. Derm., **43**, 159 (1964).
7. W. Montagna, A. Z. Eisen, A. H. Rademacher, H. B. Chase, J. Invest. Derm. **23**, 23 (1954).
8. O. Flesh, E. C. J. Esoda, Arch. Derm., **88**, 706 (1963).
9. A. G. Matoltsy, M. N. Matoltsy, J. Cell. Biol., **47**, 593 (1970).
10. J. J. Voorhees, S. G. Chakrabarti, I. A. Bernstein, J. Invest. Derm., **51**, 344 (1968).
11. S. G. Chakrabarti, I. A. Bernstein, J. Amer. Chem. Soc., **88**, 6953, 1966.
12. K. Fukuyama, W. L. Epstein, J. Invest. Derm., **49**, 595 (1967).
13. S. G. Chakrabarti, I. A. Bernstein, Fed. Proc., **26**, 369 (1967).

ST. CERC. BIOCHIM., **11**, 3, 253–258 (1974)

EFECTUL IRADIERII BENZILPENICILINEI ASUPRA ACTIVITĂȚII PENICILINAZICE

DOMNIȚA CRIȘAN, ȘTEFANIA MARCOVSKI și SORIN COMOROȘAN

Rezumat.—Activitatea enzimatică a penicilinazei din Bacillus cereus și Bacillus subtilis este modificată în mod discontinuu prin iradierea substratului benzilpenicilină, cu $\lambda = 546$ mm. La anumiți timpi de iradiere a substratului apar creșteri ale vitezei inițiale de reacție corespunzînd următoarelor valori ale parametrilor t_m și τ investigați: $t_m = 15$ sec, $\tau = 20$ sec.

Creșterile induse în activitatea penicilinazică prin iradierea benzilpenicilinei pot fi corelate cu mecanismul de rezistență bacteriană la acest antibiotic și cu comportarea tulpinilor bacteriene rezistente în prezența antibioticului iradiat.

Iradierea substratelor enzimatice specifice induce un efect de creștere a vitezei de reacție enzimatică. Acest efect apare în mod discontinuu, numai pentru anumiți timpi de iradiere a substratului (1,2,3). Timpul minim de iradiere a substratului, eficient în inducerea primei creșteri a vitezei de reacție, a fost notat t_m; creșterile de viteză ulterioare apar la timpi de iradiere a substratului $t_m + \tau$, $t_m + 2\tau$, etc.; t_m și τ apar ca noi parametri enzimatici, fiind dependenți de natura sistemului enzimatic, fiind dependenți de natura sistemului enzimatic (4,5). Investigarea acestor parametri pentru un mare număr de sisteme enzimatice a relevat posibilitatea unui nou mecanism de control (1,6,7). Acest efect indus prin iradiere a fost reprodus și pe antibiotice, determinînd modificările apreciabile ale ratelor de creștere celulară la anumiți timpi de iradiere a antibioticelor (8), comparativ cu rata de creștere în prezența antibioticului neiradiat.

Obiectul studiului prezent este determinarea comportării sistemului penicilină — penicilinază în prezența substratului iradiat, în vederea corelării dintre modificările ratei de creștere celulară, induse prin iradierea antibioticului, cu mecanismele de rezistență bacteriană.

MATERIAL ȘI METODE

Surse și condiții de iradiere. Sursa de lumină folosită pentru iradierea benzilpenicilinei este o lampă de Hg de înaltă presiune, ASH250, 70 W Astralux, corespunzînd sursei românești UV-IR-1. Expunerea substratului la timpii de iradiere selectați este efectuată cu un dispozitiv tip Uniblitz model 100 — 2, controlat electronic prin Diversatron timer (VA, Adv. Electro-Mechanical Eng. Rochester, USA). Diafragma are apertura de 2,5 cm diametru și este plasată deasupra discului de material

plastic conținînd pulberea de substrat. Precizia de măsurarea timpilor de iradiere este de 0.001 sec.

Sursa de iradiere este montată la 17 cm înălțime față de suprafața stratului de antibiotic.

Un filtru optic LKB Hg-mono $\lambda = 546$ nm (transmitanță 30%) este interpus pentru selectarea lungimii de undă de 546 nm. Detaliile procedurii de iradiere standardizate sînt cele publicate anterior (3). Cantitatea de benzilpenicilină iradiată este de 3,8 mg, răspîndită uniform pe suprafața discului de plastic (6 cm^2), respectînd astfel limita superioară de 2—3 mg substrat/cm^2, ce dă rezultate reproductibile.

După iradiere, substratul este dizolvat în tampon fosfat 2,5 mM, pH 7 ; 1 ml din această soluție de antibiotic 1mM este luat în mediul de reacție cu un volum final de 3 ml, pentru a da concentrația finală de 1 μmol benzilpenicilină/probă.

Preparate enzimatice. Preparatele de penicilinază (penicillin amidohydrolase EC 3.5.2.6) utilizate sînt : penicilinaza înalt purificată din Bacillus cereus 569/H, liofilizată (provenită de la firma Nutr. Biochem. Co.) și penicilinaza purificată din Bacillus subtilis niger (5279), după metoda descrisă de N. Citri (9). Activitatea penicilinazică este determinată după metoda microiodometrică R.P. Novick (10). Substratul utilizat este benzilpenicilina (penicilină G crist. sare de potasiu termostabilă), 1 μmol per probă. Reacția enzimatică este inițiată cu 1 mg proteină pentru penicilinaza purificată din Bacillus cereus, respectiv 0.5 mg proteină pentru penicilinaza purificată din Bacillus subtilis. Scăderea A_{620nm} este urmărită în funcție de timp, utilizînd un spectrofotometru Beckman tip *B*, cu cuve termostatate la 30°C. Citirile s-au efectuat la 15 sec interval, reacția fiind liniară timp de 2 min în aceste condiții. Activitatea enzimatică este exprimată ca ΔA_{620nm}/min. Fiecare valoare a vitezei inițiale de reacție reprezintă media a 5 determinări pentru probele de antibiotic iradiat, respectiv a 65 determinări pentru probele martor de antibiotic neiradiat.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Efectul iradierii substratului asupra vitezei de reacție penicilinazică este următorul : la anumiți timpi de iradiere a benzilpenicilinei este indusă o accelerare a vitezei inițiale de reacție. Această accelerare este exprimată ca o creștere semnificativă a ΔA_{620nm}/min, comparativ cu viteza inițială a reacției martor efectuată în aceleași condiții cu substrat neiradiat. Creșterea vitezei inițiale de reacție este constantă și reproductibilă, în cazul cînd viteza inițială se determină în condițiile experimentale ale V_{Max}.

Benzilpenicilina a fost selectată în acest experiment datorită afinității maxime a penicilinazei extrase din B. cereus 569/H pentru acest substrat. K_m-ul pentru benzilpenicilină al acestei penicilinaze este de 0,060 mM, comparativ cu methicilina 0,46 mM sau oxacilina 0,57 mM (11). Benzilpenicilina iradiată induce creșteri periodice ale vitezei inițiale de reacție. Timpul de iradiere minim, eficient în inducerea primei creșteri a vitezei inițiale, este de 15 sec.

Conform terminologiei propuse anterior (3), acest timp minim de iradiere este notat $t_m = 15$ sec; următoarele creşteri de viteză apar periodic, la 35 sec şi respectiv 55 sec timp de iradiere a benzilpenicilinei, fiind delimitate de o perioadă fixă de 20 sec (tabel 1). Această perioadă, $\tau = 20$ sec, este al doilea parametru enzimatic investigat.

O distribuţie similară a creşterilor vitezei iniţiale de reacţie, cu aceeaşi dependenţă de timpul de iradiere, este înregistrată pentru sistemul penicilinazic extras din B. subtilis.

Pentru ambele enzime se observă că nici un alt timp de iradiere a benzilpenicilinei, diferit de t_m, $t_m + \tau$, sau $t_m + 2\tau$, nu induce creşteri ale vitezei de reacţie (tabel 1). Studii anterioare pe o multitudine de sisteme enzimatice au demonstrat discontinuitatatea dependenţei efectului de timpul de iradiere a substratului, creşterile apărînd la timpi de iradiere multipli de 5 sec $\pm$ 0,1 sec (2,3).

Timpii de iradiere intermediari testaţi nu au influenţat viteza de reacţie (tabel 1), valorile medii ale vitezei iniţiale situîndu-se în domeniul de valori ale martorului. Amplitudinea creşterilor vitezei iniţiale nu creşte progresiv cu timpul de iradiere, ci apare ca un „semnal" în activitatea enzimatică.

Importanţa acestor creşteri de tip „semnal" ale vitezei de reacţie penicilinazică poate fi corelată cu mecanismul de interacţiune al drogului cu receptorul celular specific, şi deci cu mecanismul de acţiune al antibioticului. Penicilina şi derivaţii săi acţionează interferînd cu biosinteza peretelui celular bacterian. Etapa de biosinteză în care intervine penicilina este transpeptidarea D-alaninei în formarea punţilor pentapeptidice încrucişate. În etapa finală de formare a reţelei mucopeptidice cu punţi de acest tip, capătul liber al lanţului poliglicil este plasat în peptidul linear al lanţului vecin.

Formarea acestor punţi ce închid reţeaua are loc pe peretele celular, deci exterior membranei celulare, în absenţa ATP-ului sau altei surse de energie pentru biosinteză. Energia necesară formării acestor legături este furnizată prin reacţia de transpeptidare în care D-alanina terminală a pentapeptidului este eliberată (12, 13, 14).

Această funcţie de transpeptidare este extrem de sensibilă la penicilină, aceasta fiind un analog al D-alanil-D-alaninei (12) şi legîndu-se de centrul activ al transpeptidazei. Datorită naturii acestui mecanism de acţiune, s-a sugerat că penicilinaza poate fi de asemenea o transpeptidază modificată.

Considerînd acest mecanism enzimatic de acţiune al antibioticului, se poate prevedea că iradierea benzilpenicilinei ar putea determina modificări periodice ale interacţiunii antibiotic-receptor celular (enzimatic). Asemenea „semnale" se vor traduce, în mod necesar, prin scăderi concordante ale ratei de creştere bacteriană pentru aceiaşi timpi de iradiere. Rezultate preliminare pe tulpini de B. subtilis şi E. coli sensibile la penicilină confirmă această ipoteză de lucru, parametrii determinaţi fiind $t_m = 5$ sec, $\tau = 20$ sec.

Ratele de creştere ale unor tulpini de B. subtilis şi E. coli rezistente la penicilină prezintă modificări similare la aceiaşi timpi de iradiere şi, în plus, scăderi ale inhibiţiei produse de antibiotic, traduse prin rate de creştere bacteriană superioare faţă de culturile martor (antibiotic neira-

Tabela 1

Creşteri ale vitezei de reacţie induse în reacţia benzilpenicilină – penicilinază prin iradierea substratului

Timpi de iradiere a benzilpenicilinei	Viteza hidrolizei benzilpenicilinei exprimată ca ΔA_{620nm}/min (V_{Max} medie ± D.S.)			
	Penicilinaza purificată din Bacillus cereus		Penicilinaza purificată din Baccillus subtilis	
Martor (benzilpenicilină neiradiată)	0,099±0,003		0,098±0,002	
5 sec	0,102±0,0025		0,100±0,003	
10 sec	0,100±0,003		0,102±0,0025	t_m = 15 sec
15 sec	*0,114*±0,004	t_m = 15 sec	*0,117*±0,003	τ = 20 sec
20 sec	0,101±0,0025	τ = 20 sec	0,101±0,002	
25 sec	0,099±0,004		0,099±0,002	
30 sec	0,100±0,002		0,101±0,002	
35 sec	*0,112*±0,0025		*0,111*±0,004	
40 sec	0,098±0,0025		0,101±0,002	
45 sec	0,098±0,0025		0,099±0,003	
50 sec	0,098±0,0025		0,098±0,002	
55 sec	*0,112*±0,004		*0,114*±0,004	
60 sec	0,098±0,0025		0,097±0,002	
65 sec	0,098±0,0025		0,099±0,002	
70 sec	0,100±0,003		0,098±0,002	
75 sec	0,104±0,004		0,100±0,0025	

diat). Aceste scăderi ale inhibiţiei apar la $t_m = 15$ sec, $\tau = 20$ sec, concordînd deci cu creşterile de viteză induse în reacţia penicilinazică de antibioticului iradiat.

Această concordanţă arată că iradierea antibioticului influenţează interacţiunea acestuia cu receptorii celulari specifici. Pentru penicilina iradiată cu $t_m = 15$ sec, $\tau = 20$ sec, interacţiunea cu receptorul enzimatic penicilinazic este crescută, traducîndu-se prin creşteri ale vitezei de reacţie penicilinazică şi scăderi ale activităţii inhibitorii a antibioticului.

Pentru penicilina iradiată cu $t_m = 5$ sec, $\tau = 20$ sec, interacţiunea cu receptorul enzimatic, probabil transpeptidazic, al peretelui celular, este crescută, traducîndu-se prin creşteri ale activităţii inhibitorii a antibioticului, deci rate de creştere bacteriană scăzute.

Determinarea parametrilor t_m şi τ poate fi deci utilizată în investigarea unor interacţiuni specifice de tipul drog-receptor celular.

Stimularea acestei interacţiuni prin efectul de iradiere a antibioticelor poate avea implicaţii practice importante în investigarea mecanismelor de rezistenţă bacteriană.

Prezentat la redacţie la 14 decembrie 1973

Laboratorul Central de Biochimie,
Spitalul Clinic Fundeni, Bucureşti

EFFECT OF BENZYLPENICILLIN IRRADIATION ON PENICILLINASE ACTIVITY

SUMMARY

The enzymic activity of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* penicillinase is modified in a noncontinuous manner through the irradiation of the enzymic substrate, benzylpenicillin, with $\lambda = 546$ nm. Initial reaction rates are enhanced for certain substrate irradiation times, corresponding to the following values of the t_m and τ parameters investigated: $t_m = 15$ sec and $\tau = 20$ sec. The enhancements induced in the penicillinase activity through benzylpenicillin irradiation may be correlated to the mechanism of bacterial resistance to this antibiotic, as well as to the behaviour of resistant bacterial strains in the presence of the irradiated antibiotic.

BIBLIOGRAFIE

1. S. Comoroşan, Nature, **227**, 74 (1970).
2. S. Comoroşan, M. Cru and S. Vieru, Enzymologia, **42**, 31 (1972).
3. S. Comoroşan, S. Vieru and P. Murgoci, Biochim. Biophys. Acta, *268*, 620 (1972).
4. S. Comoroşan, P. Murgoci, D. Sandru and M. Cru, Physiol. Chem. Physics, **3**, 343 (1971).
5. S. Comoroşan, M. Cru, P. Murgoci, and S. Vieru, Physiol. Chem. Physics, **4**, 1 (1972).
6. S. Comoroşan, S. Vieru, D. Crisan, D. Sandru and P. Murgoci, Physiol. Chem. Physics, **3**, 1 (1971).

7. S. Comoroşan, S. Vieru, D. Crişan, D. Sandru, P. Murgoci and E. Alexandrescu, Physiol. Chem. Physics, **3**, 103 (1971).
8. G. E. Bass and D. Crişan, Physiol. Chem. Physics, in press.
9. N. Citri, N. Garber and A. Kalkstein, Biochim. Biophys. Acta, **92**, 572 (1964).
10. R. P. Novick, Biochem. J., **83**, 236 (1962).
11. N. Zyk, N. Citri, Biochim. Biophys. Acta, **151**, 306 (1968).
12. D. J. Tipper, J. L. Strominger, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **54**, 1133 (1965).
13. E. M. Wise Jr., J. T. Park, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **54**, 75 (1965).
14. W. Carter, K. S. McCarty, Ann. Int. Med., **64**, 1087 (1966).

ST. CERC. BIOCHIM., 17, 3, 259–264 (1974)

ELECTROFOREZA HEMOGLOBINEI UNOR SPECII ŞI LINII DE CIPRINIDE ÎN GEL DE POLIACRILAMIDĂ

VALENTINA JURCĂ

Rezumat. — Prin electroforeza verticală a hemoglobinei în gel de poliacrilamidă, în strat subţire, au fost constatate diferenţe în ceea ce priveşte repartizarea, numărul şi claritatea fracţiunilor, în funcţie de natura tamponului, de pH şi de concentraţia gelului. Pentru studiul electroforetic comparativ al hemoglobinelor la unele specii şi linii de ciprinide, s-a utilizat varianta cu care s-au obţinut cele mai bune separări şi anume : tamponul TRIS-HCl la pH 8,6 şi la o concentraţie a gelului de 7,4%. Se descriu particularităţile modelelor electroforetice ale hemoglobinelor speciilor şi liniilor de ciprinide investigate.

Într-o lucrare anterioară [1] au fost descrise şi caracterizate formele moleculare ale proteinelor din serul sanguin al unor specii şi linii de ciprinide. Cercetările efectuate ilustrează corelaţiile dintre polimorfismul acestor proteine şi raporturile taxonomice ale speciilor şi liniilor din cadrul aceleiaşi specii.

Ca o continuare a acestor cercetări, în lucrarea de faţă s-a întreprins un studiu comparativ al hemoglobinei diferitelor specii şi linii de ciprinide, utilizînd electroforeza în gel de poliacrilamidă. Scopul lucrării este, aşadar, să evidenţieze trăsăturile comune şi particularităţile specifice ale hemoglobinei, ca reflectare a relaţiilor mutuale dintre evoluţia moleculară şi cea biologică, la nivel intra şi interspecii, şi de a analiza condiţiile în care această tehnică se pretează pentru separarea electroforetică a acestui tip de proteină. Am utilizat electroforeza în gel de poliacrilamidă, deoarece în ultimii ani ea s-a impus ca una dincele mai eficiente tehnici de separare a proteinelor, indiferent de greutatea lor moleculară. Dintre numeroasele variante existente ale electroforezei în gel de poliacrilamidă am experimentat tehnica electroforezei în strat subţire, verticală, descrisă recent de Akroyd [4], modificată [5] şi adaptată la condiţiile noastre de lucru.

MATERIAL ŞI METODĂ

S-au folosit în experienţă speciile *Hypophtalmichtys molitrix*, *Aristhichthys nobilis*, *Ctenopharingodon idella*, *Cyprinus carpio* sălbatic şi de cultură : linia ucraineană, linia iugoslavă şi o linie autohtonă (F_1 — — formă de heterosis —) obţinută prin încrucişarea de absorbţie a crapului sălbatic indigen de Siutghiol cu crapul de cultură, rasa Lausitz.

Exemplarele de peşti supuse experienţelor s-au obţinut din heleşteele Bazei experimentale piscicole Podul Iloaiei, au fost de aceeaşi vîrstă (1 +) şi erau sexual imature. Colectarea probelor de sînge s-a făcut în perioada lunilor mai — octombrie, după procedeul descris anterior [1],

în eprubete clătite în prealabil cu soluţie apoasă de heparină (10 ml apă/1ml heparină) şi uscate.

Globulele roşii s-au separat prin centrifugarea sîngelui la 6 000 r/min, timp de 20 minute la 0° C, apoi au fost spălate de mai multe ori cu o soluţie de clorură de sodiu 0,85 %. După spălare, eritrocitele au fost hemolizate cu apă distilată, în proporţie de 1/7. Pentru migrarea electroforetică s-au aplicat probe de cîte 0,04 ml din hemolizat, care, în prealabil, a fost diluat în raport de 4 : 1 cu o soluţie de zaharoză 50 %.

Electroforeza şi prepararea gelului s-au efectuat în patru tampoane diferite şi în două concentraţii de poliacrilamidă. Reţeta tampoanelor cu proporţiile substanţelor, timpul de migrare şi voltajul care se obţine la 25 mA sînt date în tabela 1. În cursul tuturor variantelor experimentale s-a utilizat procedeul indicat de Tănăsescu şi Moldoveanu [5].

Tabela 1

Tampoanele folosite la electroforeza în gel de poliacrilamidă; cantităţile de poliacriamidă pentru 20 ml tampon şi voltajul corespunzător celor 25 mA utilizaţi

Tampon	Conc. acrilamidă	Acrilamidă g	Bisacrilamidă	EDTA g	TEMED* ml	Persulfat g	Volţi	Timp de migrare
Acid boric-borax, pH 8,4	7 %	1,33	0,070	0,02	0,06	0,010	200	8 ore
450 ml sol. de borax 0,05 M 550 ml sol. de acid boric 0,2 M	7,4 %	1,40	0,074	0,02	0,06	0,010	200	10 ore
Acid boric-borax pH 8,6 461,4 ml sol. de borax 0,05 M 375,1 ml sol. de acid boric 0,02M, apă la 1 000 ml	7,4 %	1,40	0,074	0,02	0,06	0,010	250	8 ore
Barbiturat pH 8,6 1,84 g acid dietil barbituric 10,30 g barbital de sodiu, apă la 1 000 ml	7,4 %	1,40	0,074	0,02	0,06	0,010	210	8 ore
TRIS-EDTA-borta pH 7,15 TRIS 10,8 g EDTA 1 g, Acid boric 27g, apă la 1 000 ml	7 %	1,33	0,070		0,06	0,010	325	7 ore
TRIS-EDTA-borat pH 8,4 TRIS 10,8 g	7 %	1,33	0,070		0,06	0,010	400	7 ore
EDTA 0,93 g. Acid boric 5,5 g, apă la 1 000 ml	7,4 %	1,40	0,074		0,06	0,010	250	8 ore 30 min
TRIS-HCl pH 8,6 250 ml sol. TRIS 0,2 M 125 ml sol. HCl 0,1 N, apă la 1 000 ml.	7,4 %	1,40	0,074	0,02	0,06	0,010	320	4 ore 30 min

* TEMED = N.N.N'N' – tetramethylendiamină. Electroforeza a fost efectuată la +4°C.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Din fotografiile prezentate în figura 1 apare evident faptul că o caracterizare a unei soluţii proteice eterogene nu poate fi făcută decît dacă se au în vedere mai mulţi factori. Aceşti factori ca : natura tamponului, pH-ul, concentraţia gelului de acrilamidă respectiv mărimea porilor gelului, fac ca repartizarea fracţiunilor proteice, gradul de separare şi claritatea imaginii fracţiunilor proteice separate să varieze în limite destul de largi.

Pentru sistematizarea expunerii rezultatelor, vom prezenta separările obţinute cu aceeaşi probă de hemoglobină în cele opt variante cercetate, discutînd rezultatele în funcţie de natura tamponului utilizat, de pH-ul la care s-a efectuat electroforeza şi de concentraţia poliacrilamidei.

Electroforeza în tampon de acid boric-borax, pH 8,4. În acest tampon la o concentraţie a gelului de 7 %, se separă trei fracţiuni (fig. 1 a), respectiv patru fracţiuni în gelul de 7,4 % (fig. 1 b), dintre care două fracţiuni principale — una catodică şi una anodică.

Electroforeza în tampon de acid boric-borax, pH 8,6. La acest pH şi la concentraţia gelului de 7,4 % (fig. 1 c) se separă practic acelaşi număr de fracţiuni ca în cazul tamponului de pH 8,4, însă fracţiunile sînt mai bine delimitate.

Electroforeza în tampon de barbiturat pH 8,6. În aceste condiţii (fig. 1 d) se separă şase fracţiuni, dintre care una principală şi celelalte de intensitate variabilă, foarte slabe, care nu sînt vizibile în fotografie.

Electroforeza în tampon de TRIS-EDTA-borat, pH 8,4. În tamponul acesta, la concentraţia de poliacrilamidă de 7 %, (fig. 1 f), ca şi la cea de 7,4 % (fig. 1 k), imaginea electroforetică este asemănătoare celei de la tamponul de pH 7,15, numai că, la o concentraţie mai mică a gelului, deplasarea spotului proteic are loc mult înspre anod.

Electroforeza în tampon TRIS-HCl, pH 8,6. Utilizînd acest tampon, la concentraţia gelului de 7,4 % s-au separat şapte fracţiuni. Se disting două fracţiuni principale, una catodică şi una anodică, iar restul de cinci fracţiuni prezintă intensităţi variabile (fig. 1 *l*).

După această sumară descriere a separărilor obţinute în cele opt variante experimentale, vom discuta comparativ rezultatele obţinute, în funcţie de cei trei factori luaţi în studiu.

Natura tamponului. Ne vom limita la descrierea modificărilor constatate în ceea ce priveşte viteza de migrare şi numărul fracţiunilor, descrierea fiecărei fracţiuni în parte nefiind necesară, deoarece scopul lucrării este de a adapta această tehnică la separarea hemoglobinei şi de a aduce date asupra polimorfismului acesteia. În funcţie de viteza de migrare, dependentă în primul rînd de încărcarea electrică a proteinei respective şi apoi de greutatea ei moleculară, de timpul de migrare, precum şi de alţi factori, distingem că prin electroforeza în tamponul acid boric-borax, la pH 8,4 cît şi la pH 8,6, în tamponul barbiturat de pH 8,6 şi în tamponul TRIS-HCl de pH 8,6 s-au separat un număr variabil de fracţiuni, trei în cazul primului tampon, indiferent de concentraţia gelului, şase în cel de al doilea tampon, iar în ultimul tampon s-au evidenţiat şapte fracţiuni. În tamponul acid boric-borax şi în TRIS-HCl sînt evidente două frac-

țiuni principale, una înspre catod și una înspre anod, în tamponul de barbiturat se separă o singură fracțiune principală. În cazul tamponului TRIS-EDTA-borat, la pH 7,15 și la pH 8,4, indiferent de concentrația gelului, separarea electroforetică a hemoglobinei se reduce la un singur spot a cărui viteză de migrare este mai mare în gelul de concentrație 7 %, comparativ cu cel de 7,4 %.

Influența pH-lui. Din aceleași considerente arătate mai sus, și anume în scopul separării și fracționării acestui tip de proteină am efectuat electroforeza la pH 7,15 ; 8,4 și 8,6. Cu toate că pH-ul a variat între limite relativ mici, s-au distins modificări evidente ale spectrului electroforetic ; cele mai bune separări s-au obținut la pH 8,6.

Concentrația gelului. Prin modificarea raportului dintre acrilamidă și bisacrilamidă, apare posibilitatea obținerii unor geluri cu pori de diferite dimensiuni, ceea ce face ca efectului electroforetic să i se adauge și acela de filtrare moleculară, de sită moleculară. Literatura citează că separările optime ale proteinelor au fost obținute între concentrații ale gelului de 3 % și 10 % [6]. În cercetările noastre preliminare asupra separării electroforetice a hemoglobinei, am constatat că în geluri de concentrații mai mici de 7 % are loc o migrare în masă a proteinei respective. Separările cele mai bune le-am obținut în gelul de concentrație 7,4 %, în special în privința fracțiunilor anodice, ceea ce denotă că aceste proteine prezintă greutăți moleculare mai mici.

Gradul de separare, repartizarea fracțiunilor, precum și claritatea imaginii electroforetice fiind cele mai bune în tamponul de TRIS-HCl pH 8,6 și la concentrația gelului de 7,4 %, am folosit aceste condiții în studiul electroforetic al hemoglobinei la diferite ciprinide ce populează apele țării noastre.

Așa cum reiese din figura 2, unde sînt reprezentate modelele fracționării electroforetice a hemoglobinelor la unele specii și linii de ciprinide, se constată că, pe lîngă unele asemănări, acestea prezintă și deosebiri referitoare la gradul de eterogenitate, mobilitate electroforetică și raporturile cantitative dintre diferitele tipuri de fracțiuni.

Gradul de eterogenitate al hemoglobinei este relativ mai redus la nivelul liniilor din interiorul aceleiași specii, și mai accentuat la nivelul speciilor. Astfel, la *Cyprinus carpio* sălbatic (fig. 2 S) și linia iugoslavă (fig. 2 I) s-au revelat cîte cinci fracțiuni, dar cîte patru fracțiuni la linia ucraineană (fig. 2 U) și la cea ameliorată autohtonă (fig. 2 N). La specia *Hypophthalmichtys molitrix* (fig. 2 M) spectrul electroforetic evidențiază patru benzi, la *Aristhichtys nobilis* (fig. 2 A) șase, iar la specia *Ctenopharingodon idella* (fig. 2 C) șapte fracțiuni.

În privința mobilității și a raporturilor cantitative dintre diferitele tipuri de componente se observă, de asemenea, diferențe. La speciile *Hypophthalmichtys molitrix*, *Ctenopharingodon idella* și *Aristhichtys nobilis* (fig. 2 M, C, A) spoturile hemoglobinice prezintă în general domenii de migrare relativ mai reduse comparativ cu cele de la liniile de *Cyprinus carpio* (fig. 2 S, U, I, N), în special la nivelul fracțiunilor dinspre catod. Rezultatele acestea sînt în concordanță cu cele obținute anterior [1] pe proteinele serice ale acelorași pești. Ca atare, hemoglobina, fiind o proteină, este supusă acelorași mecanisme de sinteză ca orice altă proteină, iar tipul hemoglobinei și concentrația ei sînt condiționate de existența și

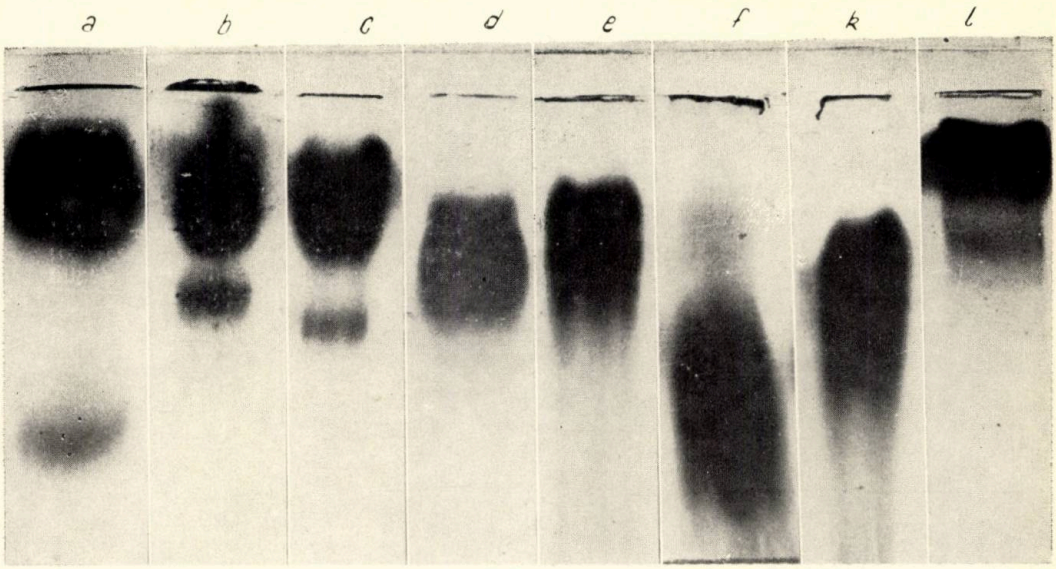


Fig. 1. — Electroforeza hemoglobinei :
În tampon acid boric-borax, pH = 8,4, concentraţia gelului 7% —a — şi 7,4% —b —; pH = 8,6, concentraţia gelului 7,4% — c —. În tampon barbiturat pH = 8,6, concentraţia gelului 7,4% — d —. În tampon TRIS-EDTA-borat, pH = 7,15, concentraţia gelului 7% — e —; pH = 8,4, concentraţia gelului 7% — f —, şi 7,4% — k —. În tampon TRIS-HCl, pH = 8,6, concentraţia gelului 7,4% — 1 —.

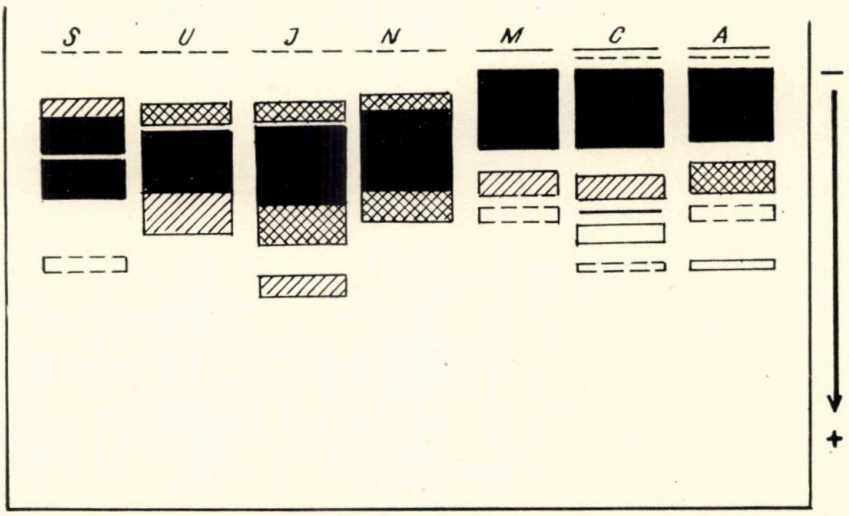


Fig. 2. — Electroforeza hemoglobinei în tampon TRIS-HCl, pH = 8,6, concentraţia gelului 7,4%, la 25 mA, 320 V, 4 ore şi 30 min., la 4° C, la Cyprinus carpio sălbatic — S—, şi de cultură : linia ucraineană — U —, linia iugoslavă — I—, linia ameliorată autohtonă —N—, la Hypophthalmichthys molitrix—M—, la Ctenopharingodon idella —C— şi la Aristhichthys nobilis —A—.

activitatea genelor structurale şi represoare respective. Mobilitatea mai mică a fracţiunilor dinspre catod ale hemoglobinelor de la speciile de peşti amintite mai sus sugerează că moleculele acestor tipuri de fracţiuni sînt mai sărace în grupări carboxilice ionizabile la pH 8,6. Menţionăm că cercetările preliminare asupra separării electroforetice a hemoglobinelor peştilor luaţi în studiu, efectuate în tampoane diferite, la pH-uri cuprinse între 7,15 şi 8,4, au evidenţiat, din punct de vedere al mobilităţii în cîmpul electroforetic acelaşi aspect ca cel descris mai sus.

Ca o trăsătură comună tuturor spectrelor electroforetice ale hemoglobinelor de la speciile şi liniile de ciprinide cercetate, se observă că dintre cele două sau trei fracţiuni majore evidenţiate, una singură domină cantitativ în toate cazurile (fig. 2).

Hemoglobina liniei de *Cyprinus carpio* ameliorate autohtone (fig. 2 N), prezintă asemănări cu aceea a crapului sălbatic (fig. 2 S) îr porţiunea dinspre catod şi cu a liniei ucrainene (fig. 2 U) în partea dinspre anod, atît în privinţa distribuţiei cît şi a numărului de fracţiuni. Aceste asemănări în structurile hemoglobinelor reflectă semnificaţia calităţilor biologice şi economice superioare ale crapului ameliorat autohton, cum sînt rezistenţa la boli, la frig, indici caracteristici crapului sălbatic, dar şi prolificitate ridicată, ritm înalt de creştere, calităţi specifice crapului de cultură. Datorită acestor calităţi, linia ameliorată autohtonă de *Cyprinus carpio* s-a dovedit ca cea mai adecvată pentru condiţiile ecologice din Moldova.

Ca o caracteristică generală trebuie subliniat faptul că modelele electroforetice ale hemoglobinelor de la ciprinidele investigate prezintă o specificitate de linie şi de specie, mai mult sau mai puţin accentuată, legată de nivelul lor taxonomic, atît în ceea ce priveşte polimorfismul cît şi mobilităţile electroforetice şi raporturile cantitative dintre diferitele tipuri de componente, sugerînd astfel existenţa unui anumit grad de conservare a unor trăsături moleculare ale hemoglobinei respective.

Polimorfismul proteinelor solubile [7] în embriogeneză, al proteinelor din serul sanguin [1], ca şi al hemoglobinei, în cadrul aceloraşi specii şi linii de ciprinide, demonstrează că diferenţele genetice la nivel intra şi interspecii, pe planul evoluţiei biochimice, nu se limitează la un singur grup de proteine.

CONCLUZII

Electroforeza în gel de poliacrilamidă s-a dovedit a fi o metodă eficace în separarea hemoglobinei. Gradul de separare, repartiţia fracţiunilor proteice, claritatea imaginii electroforetice depind de o serie întreagă de factori, dintre care în lucrarea de faţă au fost analizaţi trei şi anume : natura tamponului, pH-ul şi concentraţia gelului.

Cele mai bune separări au fost obţinute în tamponul TRIS-HCl, pH 8,6 şi cu o concentraţie a gelului de 7,4 %.

La ciprinide, spectrul electroforetic al hemoglobinelor prezintă, pe lîngă unele trăsături comune, o serie de particularităţi distinctive, în funcţie de poziţia taxonomică a speciilor şi liniilor din cadrul aceleiaşi

specii, care interesează gradul de eterogenitate, mobilitatea electroforetică şi raporturile cantitative dintre diferitele tipuri de fracţiuni.

Prezentat la redacţie
la 23 ianuarie 1974

Laboratorul de biochimie
Universitatea „A. I. Cuza"
Iaşi

ELECTROPHORESIS IN POLYACRYLAMIDE GELS OF HEMOGLOBIN IN SOME SPECIES AND LINES OF CYPRINIDAE

SUMMARY

The separation degree, fraction distribution as well as the clarity of the electrophoretic image of hemoglobin in polyacrylamide gel depend on a large number of factors, among which the present paper studies only three : buffer, pH and polyacrylamide gel concentration. The best separation has been obtained in TRIS-HCl buffer, pH 8.6 and for a gel concentration of 7.4 %. The electrophoretic spectra of hemoglobin of the species : *Ctenopharingodon idella*, *Hypophthalmichtys molitrix*, *Aristhichtys nobilis*, wild *Cyprinus carpio* and culture *Cyprinus carpio*, Yugoslav line, Ukrainian line and unimproved autochthonous line present, besides some common features, certain peculiarities of heterogeneity and electrophoretic mobility.

BIBLIOGRAFIE

1. V. Jurca, C. Matei, D. Matei, St. cerc. biochim., **17**, 171 (1974).
2. O. Smithies, Biochem. J., **61**, 629 (1955).
3. O. Smithies, Adv. Prot. Chem., **14**, 65 (1959).
4. L. P. Akroyd, Analyt. Biochem., **19**, 399 (1967).
5. D. Tănăsescu, N. Moldoveanu, St. cerc. biochim., **13**, 313 (1968).
6. L. Ornstein, Ann. N. Y. Acad. Sci., **121**, 321 (1964).
7. V. Jurca, G. Cazacu, C. Cazacu, St. cerc. biochim., **16**, 29, (1973).

ST. CERC. BIOCHIM., 17, 3, 265–270 (1974)

EFICIENȚA CAROTENOIDELOR DIN FĂINA DE MĂCEȘE ASUPRA PIGMENTAȚIEI GĂLBENUȘULUI DE OU

ELENA NICOARĂ, DOINA OȘIANU și B. DEMKÓ

Rezumat. — Făina de măceșe constituie o valoroasă sursă de pigmenți carotinoidici (aprox. 16 mg/100 g), cei mai importanți fiind β-carotina, γ-carotina, licopina, luteina, zeaxantina și rubixantina. Conținutul ridicat în vitamina C al făinii de măceșe protejează carotenoidele împotriva distrugerii oxidative prin păstrare.

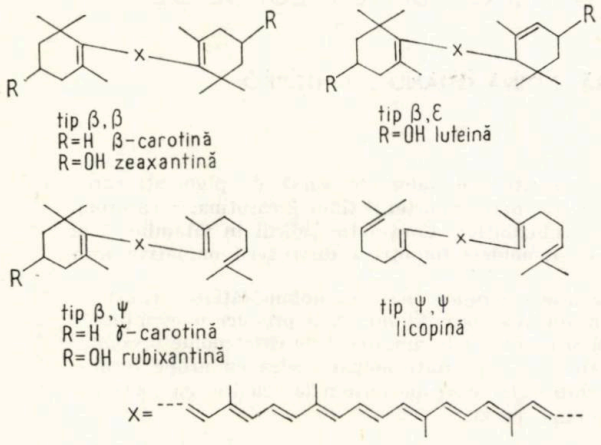
Adăugarea făinii de măceșe la hrana găinilor ouătoare îmbunătățește culoarea gălbenușului de ou, crește conținutul în provitamină A și produce o modificare a raportului dintre zeaxantină și luteină. Din amestecul de carotenoide prezente în făina de măceșe sînt absorbite și depozitate numai acelea cu grupe terminale ciclice, dar nu sînt absorbite cele cu grupe terminale aciclice, cu toate că ele se găsesc în proporție aproape egală.

Intensitatea pigmentației gălbenușului de ou depinde, în primul rînd, de existența carotenoidelor în hrana păsărilor. Diferitele carotenoide sînt absorbite și depozitate în gălbenușul de ou în mod inegal, fiind valorificate preferențial carotenoidele oxigenate (1). Pentru asigurarea unei pigmentații corespunzătoare a gălbenușului de ou, în practică se utilizează atît preparate de carotenoide sintetice, cît și o serie de produse naturale bogate în carotenoide (1), cum sînt : făina de petale de Tagetes, drojdiile furajere de tip Torula, polenul (2), boiaua (3), precum și diferite amestecuri ale acestora cu preparate de carotenoide sintetice (4).

În ultimii ani, la fabrica de conserve „Avîntul" din Oradea se produce din deșeuri de măceșe o făină a cărei utilizare ca adaus la hrana păsărilor este în curs de experimentare la întreprinderea „Avicola" din aceeași localitate. La solicitarea acestei întreprinderi am efectuat o serie de determinări privind compoziția chimică generală și conținutul în carotenoide al făinii de măceșe, precum și un studiu al valorificării carotenoidelor din acest produs, adăugat în hrana găinilor în vederea intensificării pigmentației gălbenușului de ou.

Cea mai răspîndită specie de măceș din țara noastră este *Rosa canina*. Fructele coapte de *Rosa canina* conțin peste 10 mg carotenoide la 100 g material umed (5), din care peste jumătate sînt hidroxicarotenoide. Principalele hidrocarburi prezente sînt β-carotina (β,β-caroten), γ-carotina (β,ψ-caroten) și licopina (ψ,ψ-caroten). Hidroxicarotenoidele sînt reprezentate prin zeaxantină (β,β-caroten-3,3′-diol), luteină (β,ε-caroten-3,3′-diol), rubixantină (β,ψ-caroten-3-ol) (schema 1) și alte carotenoide oxigenate secundare.

Existenţa în măceşe atît a carotenoidelor cu grupe terminale ciclice, ciclohexenice de tip β şi ε, cît şi a celor aciclice (ψ), în cantităţi aproape egale (5), permite studierea comparativă a eficienţei acestora la pigmentarea gălbenuşului de ou.



Schema 1. — Principalele carotenoide din măceşe

MATERIAL ŞI METODĂ

Pentru stabilirea eficienţei carotenoidelor prezente în făina de măceşe, asupra îmbunătăţirii pigmentaţiei gălbenuşului de ou, s-au determinat atît carotenoidele din făina de măceşe cît şi cele din ouăle produse de găini, a căror hrană a constat dintr-un furaj tipizat M_{21-5} cu un adaus de 5% făină de măceşe.

Experienţele de furajare au fost întreprinse în condiţii de producţie, pe hale, cu găini metişi Albo 70 în vîrstă de 40 săptămîni. Probele de ouă analizate au fost luate după 14 zile şi după 30 zile de furajare cu adaosul menţionat.

În cazul analizei pigmenţilor din gălbenuşul de ou s-au urmărit atît carotenoidele principale cît şi cele secundare, în vederea stabilirii capacităţii păsărilor de a absorbi şi depozita carotenoidele cu grupe terminale ciclice sau aciclice.

S-au mai stabilit compoziţia chimică brută a făinii de măceşe şi conţinutul în vitamină C. Dozarea vitaminei C s-a făcut prin metoda cu diclorfenol-indofenol. Compoziţia brută a fost stabilită prin determinarea umidităţii, cenuşii, proteinei, grăsimii, celulozei şi acidităţii totale, prin metodele curente folosite în analiza furajelor.

Conţinutul total în carotenoide şi în vitamină C al făinii de măceşe a mai fost stabilit şi după 3 luni de păstrare, la temperatura de 20—25°C, ferit de lumină.

Analiza carotenoidelor din făina de măceşe. 50 g făină de măceşe s-au extras cu un amestec de eter de petrol, acetonă şi metanol (6 :3 :1) pînă la epuizare, măsurîndu-se volumul total de extract. O cotă parte s-a saponificat cu KOH alcoolic 10% timp de o oră. După spălare, xantofilele dihidroxilice au fost extrase prin repartiţii succesive cu metanol 90%. Xantofilele dihidroxilice au fost apoi deplasate, din extractul metanolic, într-un amestec de neofalină : eter etilic (1 :1). Cele două extracte rezultate după repartiţie şi deplasare au fost bine spălate cu apă, uscate cu Na_2SO_4 sicc şi cromatografiate, separat, pe coloane de MgO : celită (1 :1). Developarea s-a făcut cu un amestec de eter de petrol şi acetonă, conţinînd pînă la 4% acetonă în cazul separării carotenoi-

delor hidrocarburice şi a celor monohidroxilice, şi pînă la 12 % acetonă în cazul separării xantofilelor dihidroxilice.

Diferitele zone au fost eluate separat, sau pe grupe, după caz, cu un amestec de eter de petrol-etanol, iar eluatele rezultate au fost aduse la un volum cunoscut.

Au fost determinate spectrofotometric maximele de absorbţie şi densităţile optice ale extractului iniţial, extractului saponificat, extractului rezultat după îndepărtarea carotenoidelor dihidroxilice, precum şi ale diferiţilor pigmenţi eluaţi cantitativ din coloanele cromatografice.

În calcule au fost folosite $E^{1\%}_{1cm}$ specific sau mediu, după caz.

Analiza carotenoidelor din gălbenuşul de ou. Dintr-o probă medie obţinută din 10 gălbenuşe s-au cîntărit pe o hîrtie de filtru 10 g şi apoi s-au introdus, cu hîrtie cu tot, într-un omogenizator conţinînd 60 ml acetonă. Omogenatul s-a filtrat printr-un filtru creţ, s-a spălat cu acetonă, iar filtratul şi lichidul de spălare s-au colectat într-un balon cotat de 100 ml. Extractul acetonic obţinut s-a ţinut în frigider 48 ore, pentru separarea grăsimilor. La o cotă parte din extractul limpede (80 ml) s-a adăugat un volum egal de eter de petrol şi apoi apă, pînă la separarea stratului de eter de petrol, care conţine totalitatea pigmenţilor carotenoidici. După cîteva spălări cu apă, extractul în eter de petrol a fost epuizat, în pîlnie de separare, cu metanol 90 %. Xantofilele dihidroxilice, libere, trec astfel în faza alcoolică, din care au fost deplasate într-un amestec de eter de petrol-eter etilic, spălînd extractul de repetate ori cu apă. După uscare cu Na_2SO_4 sicc., s-a cromatografiat pe o coloană de MgO : celită (1 :1). Coloana prezintă două zone principale, una superioară, portocalie, ce conţine zeaxantină, iar imediat sub aceasta o zonă mai îngustă galbenă, ce conţine luteină. La partea inferioară a coloanei se găseşte o singură zonă, minoră, galbenă.

Extractul în eter de petrol, rămas după îndepărtarea xantofilelor prin epuizare cu metanol, a fost spălat de 10—12 ori cu apă, uscat peste Na_2SO_4 sicc. şi cromatografiat peste MgO : celită. Cromatograma prezintă o singură zonă principală, portocalie, care conţine β-carotină şi două zone minore : una galbenă, în partea inferioară a coloanei, şi alta portocalie, situată în partea superioară a coloanei. Ambii pigmenţi eluaţi din aceste zone au avut λ max. situat la valori mai mici de 460 nm.

În vederea determinărilor cantitative de carotenoide din gălbenuşul de ou a fost măsurată densitatea optică a extractului iniţial, precum şi a diferitelor eluate de pigmenţi obţinute în urma separărilor cromatografice.

Cercetarea carotenoidelor secundare din gălbenuşul de ou. O cantitate de peste 100 g gălbenuş de ou, provenind din ouă produse de găini care au primit în hrană adaosul de 5 % făină de măceşe timp de 30 zile, a fost prelucrată după aceeaşi schemă de separare a carotenoidelor, prezentată mai sus. Toţi pigmenţii din zonele principale şi secundare au avut λ max. situat la 450 nm sau la valori mai mici, ceea ce denotă că niciunul din pigmenţii prezenţi nu are scheletul carotenoidic de tip β, ψ, sau ψ, ψ, al căror λ max. este situat la 460 nm, respectiv 470 nm.

Carotenoidele secundare identificate au fost criptoxantina şi epoxizi ai luteinei şi zeaxantinei, precum şi izomeri cis-trans ai carotenoidelor principale, β-carotină, luteină şi zeaxantină.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Din rezultatele privind compoziţia chimică a făinii din deşeuri de măceşe obţinute în întreprinderea „Avîntul", cuprinse în tabela 1, se remarcă conţinutul ridicat în carotenoide, în vitamină C şi în grăsime. Prin adăugarea de 5 % făină de măceşe, furajul conţine un plus de 8,30 mg carotenoide, 62 mg vitamină C şi 6,2 g grăsime per kg furaj. Trebuie de asemenea semnalat conţinutul ridicat în celuloză, nefavorabil alimentaţiei la păsări.

Făcînd raportul dintre conţinutul în carotenoide şi în grăsime, se constată că pentru fiecare miligram de pigment revin circa 0,8 grame grăsime. Se ştie că absorbţia carotenoidelor din hrană depinde în mare măsură de conţinutul în lipide (1).

Prin păstrarea făinii de măceşe timp de 3 luni, conţinutul de carotenoide a rămas practic nemodificat, pe cînd conţinutul în vitamină C s-a redus la jumătate. Vitamina C prezentă în făina de măceşe protejează carotenoidele din această făină împotriva autooxidării.

Rezultatele cercetărilor noastre asupra compoziţiei chimice a făinii de măceşe atestă valoarea furajeră a acesteia şi pun la dispoziţie datele necesare stabilirii adaosurilor optime la furajele combinate.

Tabela 1

Compoziţia chimică a făinii obţinute din deşeuri de măceşe

Substanţă uscată	94,17 %
Cenuşă	3,10 %
Proteină brută	6,79 %
Grăsime brută	12,24 %
Celuloză brută	31,36 %
Substanţe extractive fără azot	40,68 %
Vitamină C	132,5 mg/100 g
Pigmenţi carotenoidici	16,6 mg/100 g

Tabela 2

Carotenoidele din făină de măceşe (mg/100 g)

Carotenoide hidrocarburice:	
β-Carotină	3,83
γ-Carotină	0,83
Licopină	6,04
Carotenoide oxigenate:	
Luteină	0,37
Zeaxantină	0,96
Rubixantină şi alte xantofile	3,70

În cercetările noastre asupra carotenoidelor principale şi secundare din făina obţinută din deşeuri de măceşe, prezentate în tabela 2, am urmărit atît carotenoidele hidrocarburice cu acţiune de provitamină A, cum sînt β-carotina şi γ-carotina, cît şi licopina. Dintre carotenoidele oxigenate am urmărit în primul rînd luteina şi zeaxantina. Se ştie că aceste xantofile constituie pigmenţii obişnuiţi ai gălbenuşului de ou. Rubixantina a fost dozată împreună cu licoxantina şi alte xantofile secundare.

Analizele de carotenoide din gălbenuşul de ou, prezentate în tabela 3, scot în evidenţă efectul favorabil al adaosului de făină de măceşe. În urma hrănirii cu adaosul de 5 % făină de măceşe, timp de 14 şi 30 zile, a avut loc atît o creştere a conţinutului în β-carotină, cît şi o modificare a raportului dintre carotenoidele portocalii (β-carotina şi zeaxan-

tina) şi cele galbene (luteina şi diferiţi epoxizi), în favoarea celor dintîi, cu putere de pigmentare mai mare. Datorită acţiunii de provitamină A a β-carotinei, creşterea conţinutului în acest pigment măreşte valoarea alimentară a ouălor de consum.

Tabela 3

Carotenoidele depozitate în gălbenuş după adăugarea de 5% făină de măceşe la furajul de bază M_{21-5}
(micrograme/gram)

Felul carotenoidei	Durata hrănirii	
	14 zile	30 zile
Epoxizi de zeaxantină şi luteină	1,9	1,8
Zeaxantină	16,3	17,8
Luteină	7,2	4 ,1
Criptoxantină	<1	<1
β-Carotină	4,2	5,7
Total pigmenţi	30,1	30,2

Din analizele de carotenoide efectuate se desprind şi unele consideraţii biochimice privind metabolismul carotenoidic la păsări. Astfel, în literatură se subliniază faptul că păsările pot absorbi şi depozita în gălbenuş nu numai luteina şi zeaxantina, ci şi alte xantofile existente în hrană, unele din acestea, ca de exemplu cantaxantina (4,4′-diceto-β, β-caroten), etilesterul acidului 8′-β-apo-carotenoic şi citranaxantina (5′, 6′-dihidro-5′-apo-18′-nor-β-caroten-6′-onă) ce se obţin prin sinteză tehnică, ar fi mult mai bine valorificate decît luteina şi zeaxantina (6). Din aceste date s-ar părea că păsările depozitează carotenoidele care le stau la dispoziţie.

Din experienţele noastre rezultă că din amestecul de carotenoide prezente în făina de măceşe se găsesc depozitate în gălbenuşul de ou numai o parte din acestea, şi anume cele cu grupe terminale ciclice, cum sînt β-carotina, luteina şi zeaxantina. Carotenoidele cu grupe terminale aciclice de tip ψ, cum sînt γ-carotina, rubixantina şi licopina, care constituie carotenoidele principale din făina de măceşe, nu au fost decelate în gălbenuşul ouălor cercetate de noi, nici în ouăle provenite de la găini care au primit plusul de 5% făină de măceşe timp de 30 de zile.

Pe baza celor de mai sus se poate afirma că găinile valorifică numai o parte din carotenoidele prezente în făina de măceşe, absorbţia carotenoidelor avînd loc selectiv.

Absorbţia şi depozitarea carotenoidelor din hrană în gălbenuşul de ou depinde de scheletul carotenoidelor, fiind valorificate numai carotenoidele cu grupe terminale ciclice de tip β şi ε.

Alţi componenţi prezenţi în făina de măceşe, cum sînt lipidele şi vitamina C, acţionează favorabil asupra valorificării carotenoidelor din hrană (1). Cercetări întreprinse de C.F. Nockels şi colab. scot în evidenţă acţiunea favorabilă a vitaminei C atît asupra calităţii ouălor (7), cît şi asupra producţiei de ouă (8).

CONCLUZII

Conţinutul ridicat în carotenoide, vitamină C şi lipide al făinii de măceşe atestă valoarea furajeră a acesteia.

Adaosul de făină de măceşe (5 %) la furajul combinat de bază, duce la o îmbunătăţire a culorii gălbenuşului de ou, prin creşterea conţinutului în β-carotină şi prin modificarea raportului dintre carotenoidele portocalii (β-carotină şi zeaxantină) şi cele galbene (luteină şi diferiţi epoxizi).

Din totalul de carotenoide prezente în făina de măceşe, găinile valorifică prin depozitare în gălbenuşul de ou numai o parte din acestea, şi anume cele cu grupe terminale ciclice de tip β şi ε.

Prin păstrare, făina de măceşe îşi modifică foarte puţin conţinutul în carotenoide cu şi fără acţiune de provitamină A, pe cînd cantitatea de vitamină C se micşorează, ajungînd la jumătate după 3 luni de păstrare.

Prezentat la redacţie la 4 martie 1974

Institutul agronomic
Catedra de Chimie
Cluj

EFFICIENCY OF ROSE-HIP MEAL CAROTENOIDS UPON THE YOLK PIGMENTATION

SUMMARY

Rose-hip meal is a valuable source of carotenoid pigments (approx. 16 mg/100 g), the most important being β-carotene, γ-carotene, lycopene, lutein, zeaxanthine and rubyxanthine. The high content in vitamin C of rose-hip meal protects the carotenoids against oxidative destruction during storage.

The addition of rose-hip meal to the food of laying hens improves the egg yolk pigmentation, increases the provitamin A content and brings about a modification of the zeaxanthine/lutein ratio. Amongst the various carotenoids existing in the rose-hip meal, only those are absorbed and stored into the yolk which have cyclic end groups, while the acyclic ones are not retained, in spite of their presence in ar almost equal ratio.

BIBLIOGRAFIE

1. J. C. Bauernfeind, G. B. Brubacher, H. M. Kläui, W. L. Marusich, in *Carotenoids* ed. O. Isler, Birkhäuser Verlag Basel, 1971, p. 748.
2. V. Tămaş, Gh. Sălăjan, C. Bodea, St. cerc. biochim., **13**, 423 (1970).
3. W. P. Williams, R. E. Davies, J.R. Conch, Poultry Sci., **42**, 691 (1963).
4. Z. Mueller, M. Satava, Biol. chem. Vyz. Zvirat **5**, 499 (1969) : Chem. Abstr., **73**, 1397 d (1970).
5. G. Neamţu, Gh. Illyes, C. Bodea, Rev. roum. Biochim., **5**, 215 (1968).
6. W. L. Marusich, J. C. Bauernfeind, Poultry Sci., **49**, 1566 (1970).
7. R. B. Herrick, C. F. Nockels, Poultry Sci., **48**, 1518 (1968).
8. C. F. Nockels, Poultry Sci., **52**, 373 (1973).

ST. CERC. BIOCHIM., 17, 3, 271–278 (1974)

ZAHARURILE SOLUBILE DIN SĂMÎNȚA DIFERITELOR SPECII DE GRÎU DIN SERIA POLIPLOIDĂ A GENULUI *TRITICUM*

THEODORA PÎRVU și I. BRAD

Rezumat. — Studiul a 45 forme aparținînd la 16 specii de la nivelul celor 3 serii poliploide de grîu, cu ajutorul cromatografiei pe hîrtie a evidențiat în sămînță (după 2 luni de repaus seminal) prezența a 3—6 zaharuri solubile.
În condiții similare de analiză prezența lactozei și rafinozei la specia Triticum timopheevi, ssp. macha și ssp. compactum la fel ca strămoșul ipotetic Triticum boeoticum furnizează unele informații în sprjinul vechimii probabile a acestor specii cît și a gradului lor de înrudire.
Conținutul în glucoză se corelează negativ foarte semnificativ și semnificativ cu gradul de poliploidie la grîu. În schimb, conținutul de zaharoză și maltoză este mai mare (distinct semnificativ) la seria diploidă față de seria tetraploidă
Diferențe nesemnificative apar la seria tetraploidă comparativ cu cea hexaploidă.

În literatura de specialitate se găsesc numeroase lucrări în care s-a investigat determinarea zaharurilor solubile (mono, di și trizaharide), în diferitele stadii de maturare fiziologică a semințelor de grîu, orz și porumb (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7) din făina integrală sau din tărîțele unor soiuri din ssp. *vulgare* sau *T. durum* (8, 9, 10).

Datorită diverselor metode folosite determinarea zaharurilor solubile cît și factorilor care variază în timpul creșterii și dezvoltării plantelor, rezultatele obținute de diferiți autori variază (7).

Menger (3) folosind cromatografia pe hîrtie arată că la *T. durum*, crescut în condiții de seră, conținutul de zaharoză, maltoză, fructoză și glucoză descrește pe măsură ce avansează maturitatea seminței în timp ce conținutul de rafinoză rămîne aproximativ constant în stadiile respective.

Matsushita (5) și Abou-Guendia (7) obțin rezultate similare privind descreșterea conținutului de zaharoză, maltoză, fructoză și glucoză pe măsură ce semințele de grîu ajung la maturitatea fiziologică, dar în experiențele lor rafinoza apare numai în fazele mai tîrzii de maturare a seminței.

Peterson (9) arată prezența a 5 zaharuri în făina de grîu (zaharoză, maltoză, fructoză glucoză și rafinoză), iar *Saunders* (10) comunică numai urme de rafinoză în distribuția cromatografică a zaharurilor din făina grîului din ssp. *vulgare*.

Prezenta lucrare a fost întreprinsă în speranța că prin identificarea și determinarea cantitativă a zaharurilor solubile aflate în sămînța diferitelor specii de grîu din seria poliploidă a genului *Triticum* s-ar putea obține informații despre gradul de înrudire biochimică a acestora din urmă.

Material și metodă. S-au luat în studiu 45 forme și soiuri aparținînd la 10 specii și 6 subspecii ale genului *Triticum*, de diferite prove-

nienţe (ICCPT-Fundulea, Grădina Botanică — Bucureşti şi Gatersleben — R.D.G.).

S-a lucrat cu făină din seminţe uscate după două luni de repaus seminal.

Separarea cromatografică a zaharurilor s-a făcut din 0,5 g făină integrală extrasă cu 40—50 ml alcool etilic 80 % cald (11). Îndepărtarea grăsimilor s-a făcut prin extracţii repetate cu cloroform. Extractul alcoolic s-a adus la sec şi s-a reluat cu 1 ml apă distilată. Din această soluţie s-a picurat pe cromatograme o cantitate de 50μl. S-a folosit hîrtie cromatografică Whatman 1. Pentru separare s-a folosit sistemul butanol : acid acetic : apă (4:1:5), repetîndu-se irigarea de 7—8 ori.

Cromatografierea zaharurilor s-a făcut în sistemul obişnuit, ascendent. Revelarea cromatogramelor s-a efectuat cu o soluţie de acid ftalic şi anilină, dizolvate în *n*-butanol saturat cu apă (1:1), prin stropirea cromatogramelor. După uscare, cromatogramele s-au introdus în etuvă la 105°C, timp de 5 minute, pentru dezvoltarea culorii. Cromatogramele s-au densimetrat, evaluîndu-se în unităţi densimetrice (la un densitometru integrator tip AKI-150).

Conţinutul comparativ de zaharuri solubile s-a exprimat în unităţi densitometrice (U.D.).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Specii diploide (*n* = 7 cromozomi, genom A).

Analiza cromatografică a speciei diploide *Triticum boeoticum* Boiss em Schiem. arată prezenţa a 6 zaharuri solubile în sămînţă : fructoză, glucoză, zaharoză, maltoză, lactoză şi rafinoză. Specia *T. monococcum* L., pe 7 varietăţi cercetate, a prezentat în sămînţă numai 5 zaharuri comune cu *T. boeoticum*, cu excepţia fructozei, care a fost absentă (tabela 1).

Specii tetraploide (*n* = 14 cromozomi, genom AG şi AB)

Triticum Timopheevi Zhuk. (genom AG) a prezentat în sămînţă cele 6 zaharuri puse în evidenţă şi la *T. boeoticum*.

Triticum dicoccoides var. *spontaneo-villosum* Körn (genom AB) are în sămînţă numai 3 zaharuri solubile : fructoza, glucoza şi maltoza.

Triticum dicoccum Schübl. (genom AB), studiat pe 5 varietăţi, a prezentat pe cromatograme între 5 (*T. dicoccum* var. *atratum*) şi 3 zaharuri (*T. dicoccum* var. *farrum* şi var. *macratherum*).

Triticum durum Desf. (genom AB), analizat pe 7 varietăţi, a avut în sămînţă 3 zaharuri : fructoza, glucoza şi zaharoza, cu excepţia varietăţilor *melanopus* şi *murciense*, la care s-a pus în evidenţă şi maltoza.

Triticum turgidum L. (genom AB) are pe cromatogramele celor 5 varietăţi studiate de noi 3 zaharuri : fructoză, glucoză şi zaharoză, ca şi la *T. durum*.

Triticum turanicum Jakubz. (genom AB) are în sămînţă, ca şi *T. turgidum* şi *T. durum*, 3 zaharuri : fructoză, glucoză şi zaharoză.

Triticum polonicum L. var. *crysosperum* Körn (genom AB) are 4 zaharuri solubile în sămînţă : fructoză, glucoză, zaharoză şi maltoză.

Triticum carthlicum Nevski (= *persicum* Perc.) var. *fuliginosum* (genom AB) are în sămînţă, ca şi *T. polonicum*, 4 zaharuri.

Tabela 1

Zaharuri reducătoare sau solubile din sămînța diferitelor specii din seria poliploidă a genului Triticum (exprimate în unități densitometrice)

Nr. crt.	Specia Zaharuri	n cromo-zomi	Genom	Fructoză	Glucoză	Zaharoză	Maltoză	Lactoză	Rafinoză	Total zaharuri reducătoare
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	Seria diploidă									
1	T. boeoticum (= aegilopoides)	7	A	100	47	113	250	37	205	752
2	T. monococcum var. macedonicum	7	A	—	7	208	165	7	195	582
3	T. ,, var. sofianum	7	A	—	5	300	282	112	87	786
4	T. ,, var. vulgare (B)	7	A	—	7	111	117	30	150	415
5	T. ,, var. vulgare (G)	7	A	—	20	225	215	32	55	547
6	T. ,, var. nigricultum	7	A	—	u	312	387	62	162	923
7	T. ,, var. flavescens (F)	7	A	—	u	162	112	27	30	331
8	T. ,, var. panganuzzi	7	A	—	10	225	150	30	45	460
	Seria tetraploidă									
9	T. dicoccoides var. spontaneo-villosum	14	AB	135	20	—	182	—	—	337
10	T. timopheevi	14	AG	97	60	105	300	30	29	621
11	T. dicoccum var. majus	14	AB	160	97	u	92	5	—	354
12	T. ,, var. farrum	14	AB	152	57	—	242	—	—	451
13	T. ,, var. fuchsii	14	AB	155	30	u	125	—	—	310
14	T. ,, var. macratherum	14	AB	115	47	162	—	—	—	324
15	T. ,, var. atratum.	14	AB	125	67	225	75	30	—	522
16	T. durum var. melanopus	14	AB	115	60	125	92	—	—	392
17	T. ,, var. hordeiforme	14	AB	157	20	92	—	—	—	269
18	T. ,, var. affine (B)	14	AB	100	30	120	—	—	—	250
19	T. ,, var. affine (G)	14	AB	110	22	95	—	—	—	227
20	T. ,, var. murciense	14	AB	142	75	180	142	—	—	539
21	T. ,, var. coerulescens (Ar. Stud.)	14	AB	u	20	120	—	—	—	140
22	T. durum var. aegyptiacum	14	AB	133	97	110	—	—	—	340
23	T. turgidum var. speciosum	14	AB	110	35	105	—	—	—	250

Continuare tabela 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
24	T. turgidum var. dinurum	14	AB	162	142	300	—	—	—	604
25	T. var. iodurum (G)	14	AB	105	55	180	—	—	—	340
26	T. ,, var. buccale	14	AB	135	72	150	—	—	—	357
27	T. ,, var. megalopolitanum	14	AB	95	30	137	—	—	—	262
28	T. turanicum	14	AB	95	25	110	—	—	—	230
29	T. polinicum var. chrysospermum	14	AB	170	236	100	74	—	—	580
30	T. carthlicum var. fuliginosum	14	AB	186	110	280	126	—	—	702
	Seria hexaploidă							—	—	
31	SSp. spelta var. vulpinum	21	ABD	168	160	110	88			526
32	SSp. ,, var. rubrovelutinum	21	ABD	174	158	166	106	—	—	604
33	SSp. ,, var. duhamelianum	21	ABD	136	138	100	112	—	—	486
34	SSp. ,, var. album (B)	21	ABD	150	148	144	94	—	—	536
35	SSp. ,, var. album (G)	21	ABD	140	122	110	54	—	—	426
36	SSp. macha	21	ABD	232	97	155	225	87	325	1121
37	SSp. vavilovi	21	ABD	194	102	88	60	—	—	444
38	SSp. compactum var. wernerianum	21	ABD	215	105	80	82	30	105	617
39	SSp. ,, var. rufulum	21	ABD	287	127	170	23	72	310	989
40	SSp. spherococcum	21	ABD	190	108	174	60	—	—	532
41	SSp. vulgare var. lutes (Bezostaia 1)	21	ABD	100	56	—	74	—	—	230
42	SSp. ,, var. eryth. (Scoro-spelka 3)	21	ABD	186	108	206	132	—	—	632
43	SSp. vulgare var. eryth. (Triumph)	21	ABD	106	74	144	112	—	—	436
44	SSp. ,, var. eryth. (Harrach)	21	ABD	150	144	88	100	—	—	482
45	SSp. ,, var. miltur. (San Pastore)	21	ABD	156	122	96	132	—	—	506

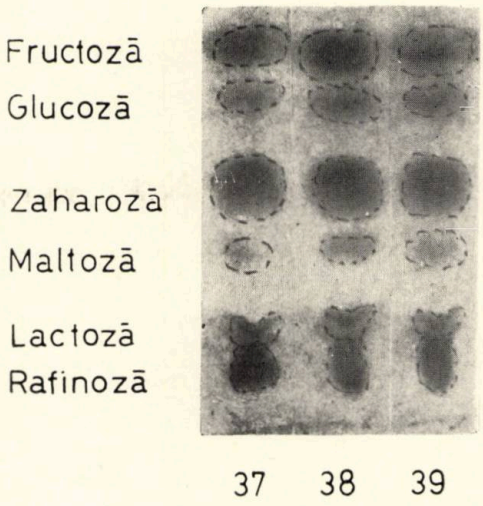


Fig. 1 — Zaharurile simple din semințele subspeciilor *compactum* (37,38) și *macha* (39).

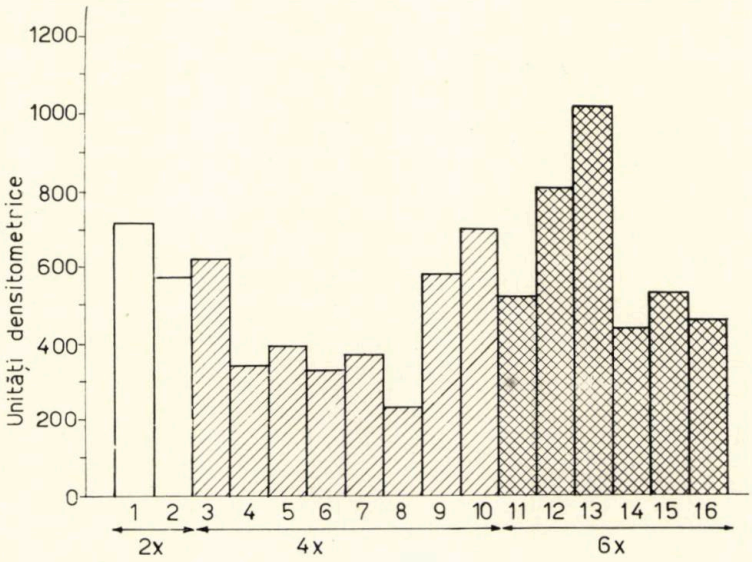


Fig. 2 — Conținutul total de zaharuri reducătoare din semințele speciilor genului *Triticum* exprimate în unități densitometrice. 1 și 2 = specii diploide; 3—10 = specii tetraploide; 11—16 = specii hexaploide.

Specii hexaploide ($n = 21$ cromozoni, genom ABD)

Triticum aestivum L. em Thell. ssp. *spelta* (L.) Thell. are, la toate cele 5 varietăți cercetate, 4 zaharuri: fructoza, glucoza, zaharoza și maltoza.

Triticum aestivum ssp. *macha* (Dek. et Men.) Mac Key a avut prezente pe spectrul cromatografic cele 6 zaharuri întîlnite la *Triticum boeoticum* și *T. timopheevi*.

Triticum aestivum ssp. *vavilovi* (Tuman.) Sears n. comb., prezintă în sămînță aceleași zaharuri găsite la ssp. *spelta*.

Triticum aestivum ssp. *compactum* (Host.) Mac Key, analizat pe 2 varietăți, are, ca și *macha*, 6 zaharuri în sămînță.

Triticum aestivum ssp. *sphaerococcum* (Perc.) Mac Key var. *rotundatum* Körn, are cele 4 zaharuri prezente la ssp. *spelta* și ssp. *vavilovi*.

Triticum aestivum ssp. *vulgare* (Vill., Host) Mac Key are prezente, ca și ssp. *spelta*, ssp. *vavilovi* și ssp. *sphaerococcum*, 4 zaharuri solubile (fructoza, glucoza, zaharoza și maltoza).

Din analiza cromatogramelor la speciile din seria poliploidă a genului *Triticum* se observă, în mod evident, că în cursul evoluției numărul de zaharuri solubile s-a redus de la 6 (la specia sălbatică *T. boeoticum*) pînă la 3 zaharuri la speciile: *T. dicoccoides*, *T. dicoccum* var. *farrum* și var. *macratherum*, *T. turanicum*, *T. turgidum* și *T. durum* (var. *hordeiforme*, *affine*, *coerulescens* și *aegyptiacum*).

Se evidențiază 6—5 zaharuri solubile în sămînța speciilor diploide, 6—3 zaharuri la formele aparținînd speciilor tetraploide și 6—4 zaharuri la subspeciile hexaploide.

Prezența celor 6 zaharuri de la *Triticum boeoticum*, la specia *T. timopheevi*, ssp. macha și ssp. *compactum* arată originea comună a acestor specii cu *T. boeoticum*.

La nivelul seriei hexaploide, prezența în sămînță a celor 4 zaharuri (fructoza, glucoza, zaharoza și maltoza) de la ssp. *spelta* și la subspeciile: *vavilovi*, *sphaerococcum* și *vulgare* arată, de asemenea, originea comună a acestor subspecii cu ssp. *spelta*, în timp ce subspeciile *macha* și *compactum* formează un grup separat (fig. 1), ele avînd în plus, în sămînță, lactoză și rafinoză (ca la speciile sălbatice *T. boeoticum* (2 x) și *T. timopheevi* (4 x) (fig. 2).

Datele noastre cu privire la prezența (în făina integrală după 2 luni de repaus seminal) a lactozei și rafinozei în condiții similare de analiză la *Triticum timopheevi*, la ssp. *macha* și ssp. *compactum*, ca și la specia sălbatică *T. boeoticum*, aduc unele informații nu numai despre gradul de înrudire al acestor specii, dar și în sprijinul vechimii probabile, susținută de diverși autori, a speciilor respective. De exemplu, specia *T. timopheevi* este, probabil, mai veche decît specia *T. dicoccoides* sau a acumulat gene minore pentru luarea în cultură (12). De asemenea, datele obținute par să confirme ipoteza susținută de (13, 14, 15) și alții, în legătură cu vechimea probabilă a subspeciei *compactum*, cît și ipoteza că ssp. *macha* ar avea

Tabe

Limitele de variaţie şi gradul de semnificaţie la zaharurile reducătoare din sămînţa di

Nr. crt.	Seria	Seria diploidă			Seria tetraploidă	
	Zaharuri	Limite de variaţie	$\bar{x} \pm s\bar{x}$	s%	Limite de variaţie	$\bar{x} \pm s\bar{x}$
1	Total zaharuri	331—923	599±63,0	34	140—702	381±53,0
2	Fructoza	0—100	la 1 specie		u —186	125±6,0
3	Glucoza	u—47	12±5,7	117	20—236	63±3,0
4	Zaharoza	111—312	207±22,0	29	0—300	122±11,0
5	Maltoza	112—387	209±3,5	42	0—300	66±15,8
6	Lactoza	7—112	42±10,4	71	0— 30	la 2 specii
7	Rafinoza	30—205	116±21,0	51	0— 29	la 1 specie

*) xx=diferenţă pozitivă distinct semnificativă
xxx=diferenţă pozitivă foarte semnificativă
**) o=diferenţă negativă semnificativă
ooo=diferenţă negativă foarte semnificativă

gene pentru ssp. *compactum* şi ssp. *spelta* (16, 17), că ssp, *macha* a jucat un rol excepţional în filogenia grîului (Menabde V. L., citat după 18 şi 19) sau că ssp. *macha* are o origine diferită de a celorlalte subspecii hexaploide (20).

Dintre zaharuri, conţinutul mediu în glucoză este mai mic (foarte semnificativ) la diploide, faţă de tetraploide, şi hexaploide, şi (semnificativ) la speciile tetraploide faţă de cele hexaploide. Zaharóza se găseşte în cantitate mai mare (distinct semnificativ) la seria diploidă, faţă de cea tetraploidă şi hexaploidă. Între seria tetraploidă şi cea hexaploidă nu există, în general, nici o diferenţă de nivelul acestui zahăr. Conţinutul în maltoză are valori superioare (cu diferenţe distinct semnificative) la seria diploidă, faţă de cea tetraploidă, şi cu diferenţe foarte semnificative faţă de seria hexaploidă. Diferenţa în plus a speciilor tetraploide faţă de speciile hexaploide pentru acest zahăr este nesemnificativă.

CONCLUZII

Studiul a 45 forme aparţinînd la 16 specii de la nivelul celor 3 serii poliploide de grîu, cu ajutorul cromatografiei pe hîrtie, a evidenţiat în sămînţă (după 2 luni de repaus seminal) prezenţa a 3—6 zaharuri solubile.

În condiţii similare de analiză, prezenţa lactozei şi rafinozei la specia *Triticum Timopheevi*, ssp. *macha* şi ssp. *compactum*, la fel ca la strămoşul ipotetic *T. boeoticum*, furnizează unele informaţii în sprijinul vechimii probabile a acestor specii, cît şi a gradului lor de înrudire.

La nivelul seriilor, speciile diploide relevă un conţinut mediu mai mare, foarte semnificativ (în privinţa cantităţii totale de zaharuri solubile), faţă de seria tetraploidă, iar speciile tetraploide un conţinut mai mic, foarte semnificativ, faţă de seria hexaploidă.

Conţinutul în glucoză se corelează negativ, foarte semnificativ şi semnificativ, cu gradul de ploidie la grîu. În schimb, conţinutul de zaharoză

la 2

feritelor specii din seria poliploidă a genului Triticum (exprimate în unități densitometrice)

	Seria hexaploidă			Diploidă-Tetraploidă		Diploidă-Hexaploidă		Tetraploidă-Hexaploidă	
s%	Limite de variație	$\bar{x}$ $\frac{1}{2}s\bar{x}$	s%	Diferența	Semnificația	Diferența	Semnificația	Diferența	Semnificația
68	230—1121	571±65,0	45	+218	xxx*)	+ 28		—190	ooo**)
23	100—287	172±10,9	25	—113	ooo	—160	ooo	— 47	
22	56—160	118±7,6	25	— 52	ooo	—106	ooo	— 54	o
43	0—206	122±10,8	36	+ 85	xx	+ 85	xx		
12	23—225	97±10,0	40	+133	xx	+122	xxx	+31	
	0— 87	la 2 specii							
	0—325	la 2 specii							

și maltoză este mai mare (distinct semnificativ) la seria diploidă, față de seria tetraploidă. Diferențe nesemnificative apar la seria tetraploidă, comparativ cu cea hexaploidă.

Prezentat la redacție la 1 februarie 1973

Institutul agronomic „N. Bălcescu"
București
Facultatea de chimie
Universitatea Craiova

SOLUBLE SUGAR IN THE SEEDS OF VARIOUS SPECIES IN THE POLYPLOID SERIES OF THE GENUS *TRITICUM*

SUMMARY

A paper-chromatografic investigation of 45 forms belonging to 16 species at the level of the three polyploid series of wheat has shown the presence of 3 to 6 soluble sugars in the seed.

Under similar analysis conditions the presence of lactose and raffinose in the species *Triticum timopheevi*, ssp. *macha* and ssp. *compactum*, just as in the hypothetical wild ancestor *Triticum boeoticum*, provides some information as to the probable antiquity of these species and their degree of relatedness.

The glucose content highly significantly and significantly correlates negatively with the degree of polyploidy in wheat. On the other hand, the sucrose and maltose content is higher (distinctly significant) in the diploid series as against the tetraploid one.

Non-significant differences have been found in the tetraploid series as against the hexaploid one.

BIBLIOGRAFIE

1. G. Harris, I. C. MacWilliam, J. Inst. Brew. (London), **60**, 387 (1954).
2. G. Harris, I. C. MacWilliam, J. Inst. Brew. (London), **63**, 210 (1957).
3. A. Menger, Ber. Getreidechem. **7**, 101 (1961).
4. A. C. Jennings, R. K. Morton, Aust. J. Biol. Sci., **16**, 318 (1963).
5. A. Matsushita, Eiyo to Shokuryo, **22**, 371 (1969).
6. A. W. MacGregor, D. E. Laberge, W. O. S. Meredith, Cereal chem., **48**, 255 (1971).
7. M. Abou-Guendia, B. L. D'Appolonia, Cereal chem., **46**, 664 (1972).
8. R. M. Saunders, H. G. Walker, Cereal chem., **46**, 85 (1969).
9. R. F. Peterson, In : Wheat, Interscience Publishers ; Inc., New York, 299 (1965).
10. R. M. Saunders, H. N. G. Kline, Cereal chem., **49**, 86 (1972).
11. J. M. Hais, K. Macek, *Cromatografia pe hîrtie*. Editura tehnică, Bucureşti, 265 (1960).
12. E. B. Wagenaar, Evolution, **20**, 150 (1966).
13. E. Schiemann, Z. Pfl. Zücht., **17**, 36 (1932).
14. J. Mac Key, Hereditas, **40**, 65 (1954 a).
15. E. Schiemann, G. J. Staudt, Züchter, **28**, 1966 (1958).
16. H. Kihara, Proceedings of the First Internat. Wheat Genet. Symp. Winn. Manit, Canada (1958), University of Manitoba, 248 (1959).
17. K. Tsunewaki, H. Kihara, Wheat Inform. Serv. **12**, *1* (1961).
18. M. M. Iakubtiner, Proceedings of the First Internat. Wheat Genet. Symp. Winn. Manit., Canada (1958), University of Manitoba, 211 (1959).
19. V. F. Dorofeev, Ghenetika, **3**, 16 (1966).
20. K. Tsunewaki, Seiken Ziho, Kyoto, Univ. Japan, **22**, 67 (1970).

APARAT DE MICROELECTROFOREZĂ CELULARĂ

AUREL POPESCU și GABRIELA DINESCU

Rezumat. – Metoda microelectroforetică este deosebit de utilă pentru studiul biofizic al suprafețelor externe ale particulelor biologice (celule, mitocondrii, nuclei etc.), în condiții foarte apropiate de cele existente „in vivo". Pentru a întreprinde astfel de studii s-a conceput și s-a realizat un aparat de microelectroforeză celulară, cu caracteristici constructive originale, a cărui descriere se face în lucrare.

Particulele de substanță suspendate în medii electrolitice capătă sarcini electrice superficiale [1]. În particular, celulele animale și vegetale, precum și particulele subcelulare, cînd sînt suspendate în soluții biocompatibile, au suprafețele externe membranare încărcate negativ [2], [3]. În consecință, ia naștere la suprafața de separare particulă-mediu un strat dublu electric, care constă din două părți : un strat compact și unul difuz (4).

Mărimile electrice care caracterizează suprafața externă a particulelor sînt potențialul electric Ψ_0 și densitatea medie de sarcină superficială σ_0. Dacă se aplică tangențial la suprafața încărcată un cîmp electric, atunci asupra celor două părți ale stratului dublu se vor exercita forțe în sensuri opuse și, prin urmare, particula încărcată se va mișca într-o direcție paralelă cu cîmpul, în timp ce partea difuză a stratului dublu se va mișca în sens opus. Suprafața care separă particula încărcată, aflată în mișcare, de masa de soluție, se numește suprafață electrocinetică, iar potențialul electric corespunzător se numește potențial electrocinetic și se notează cu ζ; acesta este, într-o primă aproximație, egal cu Ψ_0.

Din analiza distribuției de sarcină în stratul dublu și a legii de curgere a lichidelor vîscoase, care satisfac condiția $0{,}1 < \varkappa r_0 < 100$, Henry a dedus următoarea ecuație generală, pentru mobilitatea microelectroforetică (5) :

$$u = \zeta \varepsilon f(\varkappa r_0)/6\pi\eta, \qquad (1)$$

unde : $\varkappa$ = constanta Debye-Hückel, ε = permitivitatea mediului, η = coeficientul de vîscozitate, r_0 = raza particulei, iar $f(\varkappa r_0)$ = o funcție cu valori în domeniul [1, 3/2].

În cazul particulelor pentru care $\varkappa r_0 > 100$, $f(\varkappa r_0) = 3/2$. Din relația (1) rezultă cunoscuta ecuație Helmholtz-Smoluchowski, aplicabilă în cazul celulelor :

$$u = \zeta \varepsilon / 4\pi\eta. \qquad (2)$$

În condiţiile $\Psi_0 < 25$ mV, $\varkappa r_0 > 100$ şi $t = 25°C$, densitatea medie de sarcină superficială are expresia :

$$\sigma_0 = u\eta\varkappa. \tag{3}$$

MATERIAL ŞI METODĂ

1) *Descrierea aparatului.* Un aparat de microelectroforeză constă din următoarele părţi esenţiale : a) camera de migrare, b) electrozii, c) microscopul, d) sursa de curent, e) camera de termostatare.

a) *Camera de migrare.* Camera de migrare se confecţionează din sticlă şi se întîlneşte cel mai des sub două variante : cu secţiune transversală cilindrică sau cu secţiune dreptunghiulară. Camerele de migrare cu secţiune cilindrică prezintă o serie de avantaje faţă de cele cu secţiune dreptunghiulară (1). În cazul camerelor cu secţiune cilindrică se recomandă ca diametrul interior să nu fie mai mic de 1 mm, dar nici mai mare de 3 mm, iar lungimea să fie în jur de 100 mm. De asemenea, în acest caz se recomandă practicarea unei teşituri în partea centrală a tubului, în felul acesta formîndu-se, pe o porţiune de aproximativ 20 mm, o lentilă plan-concavă cilindrică. Această lentilă ajută la testarea poziţiei camerei de migrare, precum şi la fixarea rapidă a planului focal al obiectivului microscopic la nivelul staţionar.

Din considerente de optică geometrică şi pe baza fenomenului de electroosmoză în camere închise, se poate preciza poziţia nivelelor staţionare la care se fac observaţiile [1], [6].

Prototipul realizat este prevăzut cu o cameră de tip cilindric, din sticlă Jena şi montată în poziţie orizontală. Grosimea pereţilor este de 0,6 mm, diametrul interior de 2 mm, iar lungimea de 100 mm. Lentila cilindrică plan-concavă s-a realizat la I.O.R. şi are grosimea minimă de 100 μ. Deoarece diametrul interior al camerei trebuie să fie constant pe toată lungimea sa, s-au selectat prin determinări gravimetrice cu mercur cîteva tuburi dintr-un set numeros.

b) *Electrozii.* Electrozii folosiţi pot fi de mai multe tipuri. Pentru măsurători de înaltă acurateţe este necesar să se evite polarizarea excesivă a electrozilor. Pentru densităţi de curent mari se utilizează electrozi reversibili. La tării ionice mici ale electroliţilor de suspensie, în care caz se pot asigura densităţi de curent mici, electrozii de platină sînt mult mai satisfăcători, fiind mai uşor de întreţinut şi inerţi din punct de vedere biologic [6].

În cazul instalaţiei noastre electrozii sînt confecţionaţi din folii de Pt cu dimensiunile 20 $\times$ 15 $\times$ 0,2 mm, la care s-au sudat fire de Pt cu diametrul de 0,8 mm. După curăţirea perfectă a suprafeţei electrozilor, pe aceasta s-a depus electrolitic un strat fin de negru de Pt. Electroliza s-a făcut în soluţie de acid hexacloroplatinic la care s-a adăugat o cantitate mică de acetat de plumb [7].

În figura 1 se dă schema camerei de migrare, împreună cu accesoriile de umplere şi golire, cu portelectrozii şi cu electrozii de Pt.

c) *Microscopul.* Microscopul folosit în instalaţiile microelectroforetice este de cele mai multe ori monocular. Pentru camerele cu pereţi groşi

sînt necesare obiective cu distanţa de lucru mare. Ocularul trebuie să fie prevăzut cu o reţea de pătrate, calibrată cu ajutorul unui micrometru obiectiv.

Microscopul folosit de autori este de tipul M.L.4, produs de I.O.R., la care s-au făcut unele adaptări. Astfel, s-a ataşat solidar cu microviza

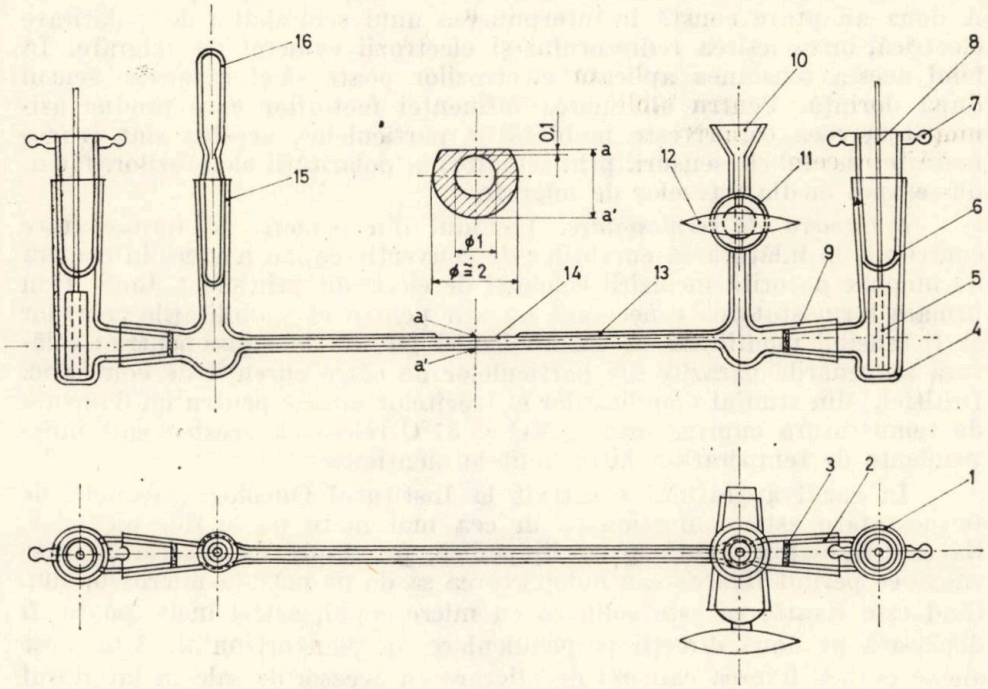


Fig. 1. — Schema camerei de migrare şi a accesoriilor sale. 1, 4, 9, 15 = şlifuri mamă. 2, 6, 16 = şlifuri tată. 3 = disc de sticlă poroasă. 5 = electrod de Pt. 7 = urechea portelectrodului. 8 = conductor din Pt. 10 = pîlniuţă. 11, 12 = robinet. 13 = tubul camerei de migrare. 14 = lentila cilindrică plan-concavă.

un şurub micrometric care măreşte de două ori precizia localizării în profunzime a obiectivului, dînd şi posibilitatea să se cunoască poziţia obiectivului cînd microviza efectuează mai multe turaţii (ceea ce este cazul la suprapunerea planului focal al obiectivului peste nivelul staţionar). Monturile lentilelor frontale ale obiectivelor $\times 10$, $\times 20$ şi $\times 40$ au fost cimentate astfel încît obiectivele să poată fi utilizate subacvatic, condiţie indispensabilă pentru metoda microelectroforetică. S-a înlocuit un ocular al microscopului cu un ocular $\times 15$ la care s-a adaptat o reţea formată din 9×9 pătrăţele care, pentru obiectivul $\times 20$, au latura de 27 μ. Pentru a asigura o bună iluminare a camerei de migrare, aflată mai sus de nivelul măsuţei microscopului, s-a înlăturat lentila superioară a condensorului de lumină. Microscopul este aşezat pe o măsuţă ce poate fi reglată în plan orizontal.

d) *Sursa de curent.* Sursa de curent trebuie să fie înalt stabilizată în tensiune, astfel încît să asigure aceeaşi tensiune între electrozi, indiferent de rezistenţa de sarcină.

S-a folosit ca sursă de curent un redresor stabilizat în tensiune, realizat de Laboratorul de electronică al Institutului oncologic, la care s-au făcut două adaptări. Prima constă în aceea că instrumentul de măsură al redresorului funcţionează, după dorinţă, atît ca voltmetru (pe două scări ce acoperă domeniul de tensiune 0—250 V) cît şi ca ampermetru (pe trei scări de sensibilitate : 0—100 μA, 0—1 mA şi 0—50 mA). A doua adaptare constă în interpunerea unui schimbător de polaritate electrică, între ieşirea redresorului şi electrozii camerei de migrare. În felul acesta tensiunea aplicată electrozilor poate să-şi inverseze sensul după dorinţă. Pentru eliminarea influenţei factorilor care produc asimetrii în ceea ce priveşte mobilităţile particulelor, acestea sînt cronometrate, în ambele sensuri, prin schimbarea polarităţii electrozilor, făcîndu-se apoi media vitezelor de migrare.

e) *Camera de termostatare.* Lichidul din camera de termostatare contribuie la înlăturarea curenţilor de convecţie ce iau naştere în camera de migrare datorită încălzirii coloanei de electrolit prin efect Joule. Prin urmare termostatarea e necesară nu atît pentru că mobilităţile celulelor ar fi sensibil modificate de metabolismul lor, cît mai ales pentru a înlătura antrenările parazite ale particulelor de către curenţii de convecţie. Dealtfel, din studiul mobilităţilor eritrocitelor umane pentru un domeniu de temperatură cuprins între 1,5°C şi 37°C reiese că acestea sînt independente de temperatură între limitele menţionate [6].

În cazul aparatului construit la Institutul Oncologic, camera de termostatare este confecţionată în cea mai mare parte din plexiglas. Ea este în esenţă o cutie paralelipipedică, prevăzută cu o serie de piese anexe ce permit fixarea sau îndepărtarea sa de pe măsuţa microscopului. Cînd este fixată, ea este solidară cu microscopul, astfel încît poate fi deplasată pe două direcţii perpendiculare, în plan orizontal. Alte piese anexe permit fixarea camerei de migrare cu accesoriile sale în interiorul cuvei de termostatare, reglarea ei în plan orizontal şi fixarea corectă a nivelelor staţionare. Camera de termostatare e prevăzută cu două şlifuri de racordare la un ultratermostat. O vedere de ansamblu a microscopului şi a cuvei de termostatare fixată pe măsuţa sa este dată în figurile 2a şi 2b.

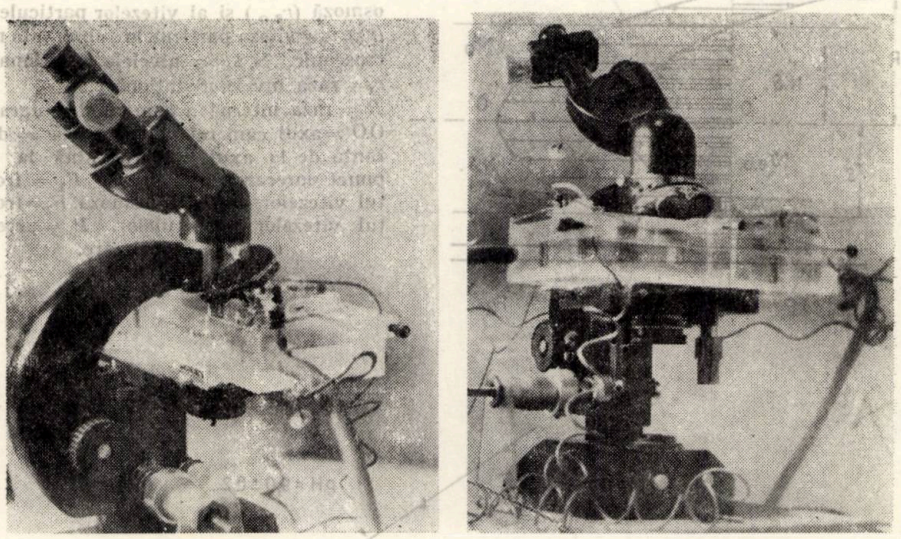
2) *Etalonarea şi testarea aparatului.* În contact cu soluţiile electrolitice peretele de sticlă al camerei de migrare se încarcă electric negativ şi astfel în vecinătatea sa se formează un strat dublu electric avînd în partea difuză un exces de cationi. Cînd se aplică o diferenţă de potenţial la extremităţile camerei, cationii din stratul difuz vor migra spre catod, datorită fenomenului de electroosmoză. Camera de migrare fiind închisă, electrolitul curgînd pe lîngă perete spre catod, va refula în mod obligatoriu spre anod, prin zona centrală a camerei. În consecinţă, vor exista în cameră nişte straturi în care viteza electrolitului este nulă; acestea sînt nivelurile staţionare.

Poziţia nivelurilor staţionare, spectrul vitezelor de electroosmoză şi al vitezelor particulelor încărcate electric sînt prezentate în figura 3, pentru o cameră cu secţiune cilindrică. În acest caz nivelurile staţionare formează un cilindru coaxial cu peretele camerei şi situat la distanţa r_s

de axul ei [8] :

$$r_s = R/\sqrt{2} \cong 0{,}707\ R. \qquad (4)$$

Etalonarea unui aparat de microelectroforeză constă, în esenţă, în determinarea teoretică şi experimentală a poziţiei nivelurilor staţionare din camera de migrare.



a *b*

Fig. 2a şi 2b. — Fotografia de ansamblu a microscopului şi a cuvei de termostatare fixată pe măsuţa sa.

Reprezentînd grafic $u = f(r^2)$, se obţine o dreaptă cu coeficientul unghiular negativ. Pe baza observaţiei de mai sus şi pe baza faptului că mobilităţile eritrocitelor umane în 0,145 M NaCl sînt constante într-un domeniu larg de pH ($5 < \text{pH} < 9$), s-a elaborat o metodă de etalonare a aparatelor de microelectroforeză [6]; cu această metodă s-au determinat mobilităţile eritrocitelor umane pentru pH = 6 şi pH = 9, la patru adîncimi în camera de migrare. Pentru fiecare pH s-a făcut reprezentarea $u = f(r^2)$, (fig. 4). Pentru fiecare punct de pe drepte s-au făcut cîte 15 determinări ale mobilităţilor eritrocitelor în ambele sensuri şi s-a folosit media aritmetică a valorilor găsite. Din punctul de intersecţie al celor două drepte s-a calculat poziţia nivelului staţionar şi s-a găsit : $r_s = (0{,}612 \pm 0{,}001)$ mm. De menţionat că această etalonare trebuie să se facă ori de cîte ori se înlocuieşte camera de migrare. Valoarea calculată teoretic este : $r_s = (0{,}642 \pm 0{,}014)$ mm, ceea ce demonstrează o concordanţă bună cu valoarea experimentală. Pentru măsurătorile ulterioare se foloseşte întotdeauna nivelul staţionar determinat experimental.

După etalonarea aparatului s-au determinat mobilităţile eritrocitelor umane în două soluţii de suspensii diferite. Pentru eritrocitele

umane suspendate în 0,145 M NaCl (pH = 7) s-a găsit : $u = (1{,}11 \pm$ $\pm$ 0,03)μ. cm. $V^{-1}\,s^{-1}$, $P < 0{,}01$. În literatură sînt date următoarele valori pentru mobilităţi : 1,08 $\pm$ 0,03 ; 1,07 $\pm$ 0,02 şi 1,10 μ. cm. $V^{-1}\,s^{-1}$[6], [9]. Pentru eritrocitele umane suspendate în : 0,201M zaharoză + 0,012M

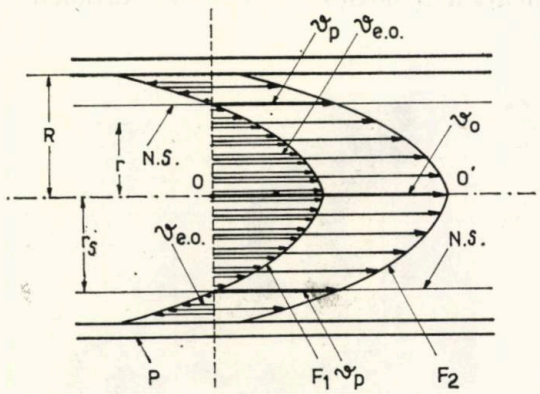


Fig. 3. — Spectrul vitezelor de electroosmoză ($v_{e.o.}$) şi al vitezelor particulelor (v_p). v_0 = viteza particulelor, observată microscopic. N.S. = nivelele staţionare. r_s = raza nivelelor staţionare. R = raza internă a camerei de migrare. OO' = axul camerei de migrare. r = distanţa de la axul camerei pînă la un punct oarecare din cameră. F_1 = frontul vitezelor de electroosmoză. F_2 = frontul vitezelor particulelor. P = pereţii camerei de migrare.

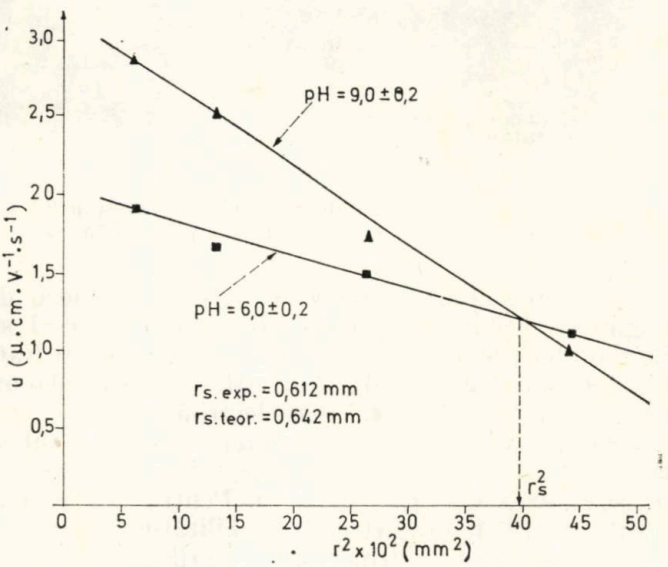


Fig. 4. — Curbele de etalonare a aparatului de microelectroforeză, în cazul unei camere cu $R = 0{,}946$ mm. $r_{s.\,exp.}$ = poziţia experimentală a nivelului staţionar. $r_{s.\,teor.}$ = poziţia teoretică a nivelului staţionar. u = = mobilitatea electroforetică (μ.cm.$V^{-1}\,s^{-1}$).

Na_2HPO_4 + 0,003M NaH_2PO_4 + 0,044M NaCl (pH = 6,4) s-a găsit u = = (1,73 $\pm$ 0,03) μ.cm.$V.^{-1}s^{-1}$, $P < 0{,}01$. În literatură se dau următoarele valori ale mobilităţilor măsurate în aceleaşi condiţii : 1,68 [10] şi 1,64 μ. cm. V^{-1}. s^{-1} [11].

Linearitatea curbelor $u = f(r^2)$, intersecţia lor în apropierea nivelului staţionar calculat teoretic, precum şi concordanţa rezultatelor cu cele găsite de alţi autori sînt dovezi ale unei etalonări corecte [6].

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Aparatul de microelectroforeză a fost pus în funcţiune în cadrul Sectorului de biologie moleculară al Institutului oncologic [12]. El a fost realizat din necesitatea de a studia unele proprietăţi ale membranelor externe ale particulelor celulare şi subcelulare, neexistînd posibilitatea de procurare a unui aparat din import.

Studiile microelectroforetice arată că celulele embrionare, celulele normale şi, mai ales, celulele neoplazice prezintă, cu mici excepţii, densităţi de sarcină electrică (deci şi mobilităţi) mai mari decît omoloagele lor normele [13], [14].

Aparatul realizat de noi a fost întrebuinţat în vederea caracterizării parametrilor electrocinetici ai mitocondriilor normale, ai celor extrase din ţesuturi de animale purtătoare de tumori [15] şi ai mitocondriilor extrase din tumori [16]. De asemenea, s-a folosit pentru caracterizarea suprafeţelor externe ale membranelor celulelor normale şi tumorale (de şobolan şi şoarece) iradiate şi radiosensibilizate cu iodacetamidă, oleilamină şi N-etilmaleimidă [17].

Observaţia că mitocondriile extrase din celulele purtătorilor de tumoare prezintă mobilităţi crescute faţă de cele normale pare să sugereze că prezenţa tumorii induce alterări asemănătoare celor găsite la celulele tumorale, în membranele celulare şi subcelulare din ţesuturile gazdei. Mobilităţile crescute [15], [16] se datorează modificărilor sarcinilor electrice superficiale [18], modificări induse de factorii fizici (radiaţiile X) şi chimici (radiosensibilizatorii) folosiţi.

Problemele de biofizică celulară ce pot fi abordate cu ajutorul metodei microelectroforetice sînt departe de a fi epuizate, căci această metodă se află în faza de adolescenţă, aşa cum arăta o autoritate în materie [19], adăugînd că, pînă în prezent, metodele pe baza cărora să se poată face deducţii asupra structurii suprafeţelor celulare sînt extrem de puţin adecvate, microelectroforeza fiind în mod particular promiţătoare.

CONCLUZII

Studiul parametrilor bioelectrici Ψ_0 şi σ_0 de la suprafaţa externă a particulelor biologice se poate face cel mai uşor, în condiţii nedistructive, cu ajutorul metodei microelectroforetice.

Din descrierea aparatului realizat de autori se desprind concluzii practice pentru cei ce, eventual, doresc să-şi construiască cu mijloace locale, un aparat similar.

Aparatul prezintă avantajul de a da posibilitatea ca părţile sale componente (microscopul, redresorul stabilizat, ultratermostatul etc.) să poată fi folosite independent pentru alte studii.

Autorii ţin să exprime mulţumiri, şi pe această cale, prof. Octav Costăchel, pentru sprijinul acordat în realizarea aparatului.

Prezentat la redacţie la 16 ianuarie 1974.

Institutul Oncologic
Sectorul de biologie moleculară. Bucureşti

CELLULAR MICROELECTROPHORESIS APPARATUS

SUMMARY

The microelectrophoretic method is useful for biophysical study of external surfaces of the biological particles (cells, mitochondria, nuclei, etc.). This study can be done under conditions very similar to those existing *in vivo*. In order to perform such a study, an original cellular microelectrophoresis apparatus was realized, the description of which is presented in the present paper.

BIBLIOGRAFIE

1. D. J. Shaw, *Electrophoresis*. Academic Press, London, New York, 1969, p. 1.
2. L. Weiss, Exptl. Cell. Res., **51**, 609 (1968).
3. W. Korohoda, Folia Biol., **12**, 144 (1964).
4. J. Th. G. Overbeek, J. Lijklema, În : Electrophoresis, Editor M. Bier, Academic Press, New York, London, 1960, p. 427.
5. C. Ch. Jr. Brinton, M. A. Lauffer, În : Electrophoresis, Ed. M. Bier, Academic Press, New York, London, 1960, p. 1.
6. G. V. F. Seaman, În : Symp. Cell Electrophoresis, Ed. E. J. Ambrose, J&A Churchill Ltd. London, 1965, p. 4.
7. C. Luca, *pH-ul şi aplicaţiile lui*, Edit. tehnică, Bucureşti, 1964, p. 72.
8. L. Weiss, *The Cell Periphery, Metastases and Other Contact Phenomena*. North Holland Publishing Company, 1967, p. 228.
9. G. V. F. Seaman, D. H. Heard, Blood, 599 (1961).
10. G. H. Eylar, M. A. Madoff, O. V. Brody, J. L. Oncley, J. Biol. Chem., **237**, 1992 (1962).
11. P. S. Vassar, *Nature*, London, **197**, 1215 (1963).
12. A. I. Popescu, G. Dinescu, *Aparat de microelectroforeză celulară*. Cerere de Inovaţie, 22 dec. 1972.
13. G. F. Furhman, În : Symp. Cell. Electrophoresis, Ed. E. J. Ambrose, J&A Churchill, Ltd. London, 1965, p. 85.
14. P. S. Vassar, Lab. Investigations, **12**, 1072 (1963).
15. C. Mihai, G. Dinescu, A. I. Popescu, Rev. roum. Biochim., **10**, 191 (1973).
16. G. Dinescu, C. Mihai, A. I. Popescu, *Ninth International Congress of Biochemistry*, Stockholm, July, 1973.
17. G. Dinescu, A. I. Popescu, C. Mihai, *Eighth International Congress of Chemotherapy*, Athens, September 8, 1973.
18. T. E. Thompson, B. D. Mc. Lees, Biochim. Biophys. Acta, **50**, 213 (1961).
19. G. Ruhenstroth-Bauer, În : Symp. Cell. Electrophoresis, Ed. E. J. Ambrose, J&A Churchill Ltd. London, 1965, p. 1.

ST. CERC. BIOCHIM., 17, 3, 287–295 (1974)

SEPARAREA CROMATOGRAFICĂ ŞI CARACTERIZAREA ELECTROFORETICĂ, CINETICĂ ŞI IMUNOCHIMICĂ A FOSFATAZEI ACIDE DIN SEMINŢELE DE PORUMB GERMINATE

DOINA POPOV

Rezumat. — Fosfataza acidă din coleoptilul şi rădăcinile seminţelor de porumb germinate a fost analizată prin cromatografie pe schimbătorul de ioni DEAE-celuloză, în tampon TRIS-HCl 0,01 M pH 7,6 şi acid acetic-acetat de sodiu 0,01 M pH 5,5. Fosfataza acidă din scutelul seminţelor de porumb germinate s-a cromatografiat pe P-celuloză în tampon TRIS-HCl 0,025 M pH 7,5.

Maximele enzimatice separate au fost caracterizate sub aspect electroforetic — — în gel de agaroză —, cinetic şi imunochimic.

Rezultatele noastre au arătat că izoenzimele fosfatazei acide se menţin aceleaşi în cursul primelor etape de dezvoltare ontogenetică a porumbului, putînd fi însă prezente sub una sau mai multe forme moleculare.

Lucrarea de faţă reprezintă o continuare a cercetărilor noastre anterioare în care am caracterizat fosfataza acidă din primele etape de creştere ale porumbului, sub aspect electroforetic (1, 2) şi imunochimic (3), şi am stabilit pH-ul său optim de acţiune şi comportarea sub influenţa efectorilor (4). Fosfataza acidă din frunzele de porumb a fost cercetată şi sub aspectul separării cromatografice pe schimbătorul de ioni DEAE-celuloză, urmat de caracterizarea maximelor obţinute prin particularităţile specifice de reacţie (5).

Abordarea studiului formelor moleculare cromatografic distincte ale fosfatazei acide din coleoptilul, rădăcinile şi scutelul seminţelor de porumb germinate şi caracterizarea maximelor enzimatice separate, sub aspect electroforetic, cinetic şi imunochimic, constituie un aspect ce întregeşte datele din literatura asupra acestei enzime. Unele cercetări disparate, realizate pînă în momentul de faţă, au cuprins determinarea pH-ului optim de acţiune şi identificarea localizării intracelulare a fosfatazei plantulelor de porumb (6), ca şi separarea electroforetică a enzimei din extracte brute de plantule şi scutel (7—9).

Scopul lucrării de faţă este, pe de o parte, caracterizarea fosfatazei acide din organele seminţelor de porumb germinate, sub aspectul separării prin cromatografie de schimb ionic, şi, pe de altă parte, cercetarea particularităţilor electroforetice, cinetice şi imunochimice ale enzimei acestor organe, în comparaţie cu proprietăţile fosfatazei foliare. Acest al doilea obiectiv ne-a fost sugerat de rezultatele obţinute de noi pînă în momentul de faţă : enzima din preparatele brute ale organelor seminţelor germinate şi cea din frunze evidenţiau comportări electroforetice (2) şi pH-uri optime diferite (4), deşi fosfataza foliară prezenta comportări similare sub influenţa efectorilor (4) şi caracteristici antigenice comune

cu enzima din etapele ontogenetice anterioare ale dezvoltării porumbului (3).

MATERIAL ŞI METODE

Materialul vegetal utilizat a fost coleoptilul, rădăcinile şi scutelul seminţelor de porumb (HD—208) germinate timp de 6 zile la întuneric. Conţinutul în apă al coleoptilului a fost de 91,5 %, al rădăcinilor de 92,8 %, iar al scutelului de 30,0 %.

Preparatele de fosfatază acidă s-au obţinut conform metodei stabilite anterior pentru fosfataza acidă din frunzele de porumb (5). Fracţiunea enizmatic activă separată în urma gel filtrării pe coloană de Sephadex G—25 în tampon TRIS—HCl 0,05 M pH 8 şi Sephadex G—100 în tampon acid acetic-acetat de sodiu 0,1 M, pH 5,5 conţinînd NaCl 0,1 M s-a supus cromatografierii pe coloană de DEAE-celuloză (2 × 20 cm), în tampon TRIS—HCl 0,01 M, pH 7,6 sau în tampon acid acetic-acetat de sodiu 0,01 M, pH 5,5. Eluţia enzimei de pe coloană s-a realizat în gradient liniar de concentraţie de NaCl (0—0,5 M), în tamponul de cromatografie. Fosfataza acidă din scutelul seminţelor de porumb germinate s-a cromatografiat pe o coloană de P-celuloză, în tampon TRIS—HCl 0,025 M, pH 7,5 (10). Eluţia enzimei de pe coloană s-a făcut în trepte, cu o soluţie tampon de echilibrare conţinînd NaCl 0,05 M şi cu o soluţie de substrat (β-glicerofosfat de sodiu). S-au colectat 80—100 de fracţiuni de cîte 5 ml.

Diagramele de eluţie ale fosfatazei acide de pe DEAE—celuloză, s-au trasat folosind ca substrate ale enzimei pirofosfatul de sodiu (10 μM), β-glicerofosfatul de sodiu (50 μM) şi p-nitrofenilfosfatul de sodiu (pNPP) (7 μM). Eluţia enzimei de pe P-celuloză s-a urmărit prin determinarea activităţii faţă de β-glicerofosfat ca substrat. Determinarea activităţii fosfatazei faţă de aceste substrate s-a realizat în aceleaşi condiţii ca cele stabilite anterior pentru fosfataza foliară (5).

Conţinutul în proteină al eluatelor s-a determinat colorimetric, prin metoda Lowry modificată de Miller (11).

Electroforeza şi imunoelectroforeza fosfatazei acide din extractele brute şi din fracţiunile cromatografice s-a urmărit în gel de agaroză 1 %, în condiţiile utilizate anterior (3).

Cercetarea caracteristicilor cinetice ale enzimei eluate s-a realizat prin stabilirea valorilor constantei Michaelis (K_m) şi ale vitezei maxime relative (V_{max}), faţă de pNPP ca substrat, prin metoda grafică Lineweaver—Burk (12).

Caracterul antigenic al fosfatazei eluate s-a urmărit prin compararea aspectului relevat la dubla difuzie după Ouchtelony faţă de un ser imun antifrunză de porumb.

Evidenţierea activităţii fosfatazei acide pe electroforegrame, pe plăcile de dublă difuzie şi imunoelectroforeză s-a realizat prin azocuplare cu α-naftil fosfat de sodiu, ca substrat, şi Fast Garnet GBC, ca agent de cuplare (13).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Separarea cromatografică a fosfatazei acide din coleoptilul, rădăcinile și scutelul semințelor de porumb germinate.

Separarea cromatografică pe DEAE-celuloză, în tampon TRIS-HCl, a fosfatazei acide din coleoptilul și rădăcinile plantulelor evidențiază un singur maxim al enzimei, activ asupra celor trei substrate testate (fig. 1). Acesta se eluează de pe schimbător la valori de concentrații ale gradientului de NaCl cuprinse între 0,1 — 0,3 M.

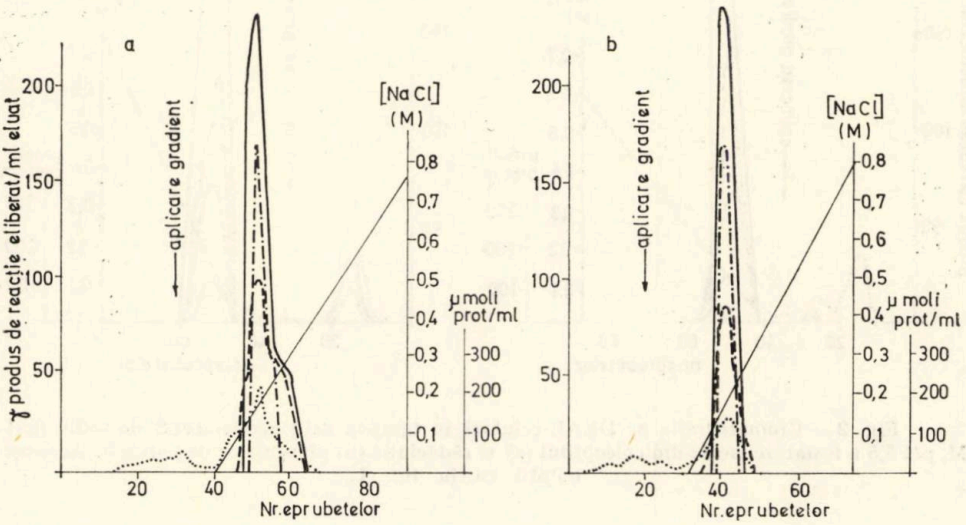


Fig. 1 — Cromatografia pe DEAE-celuloză în tampon TRIS-HCl 0,01 M pH 7,6 a fosfatazei acide din coleoptilul (a) și rădăcinile (b) plantulelor de porumb.
—— γP_i eliberat din pirofosfatul de sodiu, ca substrat/ml de eluat.
—○—○ γP_i eliberat din β-glicerofosfatul de sodiu, ca substrat/ml de eluat.
— — — γ*p*-nitrofenol eliberat din *p*-NPP, ca substrat/ml de eluat.
..... μmoli proteină/ml eluat.

Prin cromatografia pe DEAE-celuloză în tampon acid acetic-acetat de sodiu, ambele organe, ale plantulei separă două maxime cu activitate fosfatazică: unul minor, ce trece neadsorbit, și celălalt major, eluat de pe schimbător la concentrații ale gradientului de NaCl cuprinse între 0,02 — 0,28 M (fig. 2). Separarea în tampon acetat a unui număr mai mare de fracțiuni cromatografice ale fosfatazei acide a fost observată de noi și la frunzele de porumb (5). Heterogeneitatea cromatografică remarcată în acest tampon este datorată, desigur, unor modificări ale stării de ionizare a moleculelor enzimei. Această concluzie concordă cu rezultatele obținute de Staples și McCarthy (14); acești autori au observat, în prezența ionilor de acetat, un număr mai mare de fracțiuni

electroforetice ale fosfatazei acide din frunzele de fasole, comparativ cu tamponul TRIS—HCl.

Datele prezentate în figura 1 şi figura 2 atestă diagrame de eluţie de pe DEAE-celuloză, similare, pentru fosfataza acidă din coleoptilul şi rădăcinile plantulelor de porumb. Profilele de eluţie asemănătoare faţă de cele trei substrate testate, specificitatea de substrat scăzînd în

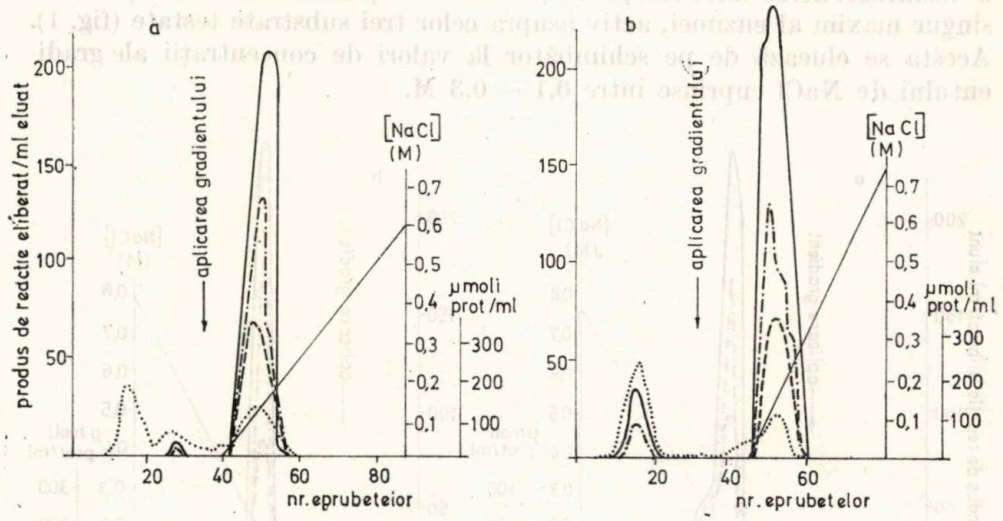


Fig. 2 — Cromatografia pe DEAE-celuloză în tampon acid acetic-acetat de sodiu 0,01 M, pH 5,5 a fosfatazei acide din coleoptilul (a) şi rădăcinile (b) plantulelor de porumb. Aceleaşi notaţii ca în fig. 1.

aceeaşi ordine : pirofosfat > β-glicerofosfat > pNPP, ca şi eluţia enzimei adsorbite la valori foarte apropiate de concentraţie a gradientului, ne sugerează existenţa unei aceleiaşi enzime în coleoptilul şi rădăcinile plantulelor de porumb.

Diagramele de eluţie de pe DEAE-celuloză ale fosfatazei acide din coleoptili şi rădăcini (plantule) sînt diferite de cele evidenţiate de enzima foliară (5). Astfel, fosfataza plantulelor se eluează de pe schimbător în 1—2 fracţiuni, după tamponul utilizat, pe cînd enzima din frunze se separă în 2—3 fracţiuni cromatografice. O altă diferenţă se remarcă la valorile concentraţiei gradientului la care se eluează fracţiunea fosfatazică majoră. Aceste valori sînt situate între 0,02—0,30 M în cazul fosfatazei plantulelor, şi mult crescute — 0,15—1,00 M — în cazul enzimei frunzelor. Compararea specificităţii de substrat a maximelor fosfatazice separate constituie un nou criteriu de diferenţiere a enzimei din plantule şi frunze. Astfel, enzima din coleoptili şi rădăcini este mai activă asupra β-glicerofosfatului, comparativ cu pNPP, pe cînd fosfataza acidă din frunze hidrolizează mai uşor pNPP decît β-glicerofosfatatul (5). Dovezile de mai sus atestă existenţa unor proprietăţi diferite ale fosfatazei acide din plantule, faţă de cea din frunzele de porumb.

Fosfataza acidă din scutelul semințelor de porumb germinate evidențiază la cromatografia pe P-celuloză un maxim neadsorbit (ce conține și activitatea fosfodiesterazică a extractului (15)), un maxim eluat în prezență de NaCl 0,05 M și un altul — principal — eluat cu substratul (β-glicerofosfat) (fig. 3). Activitatea fosfatazică pronunțată manifestată

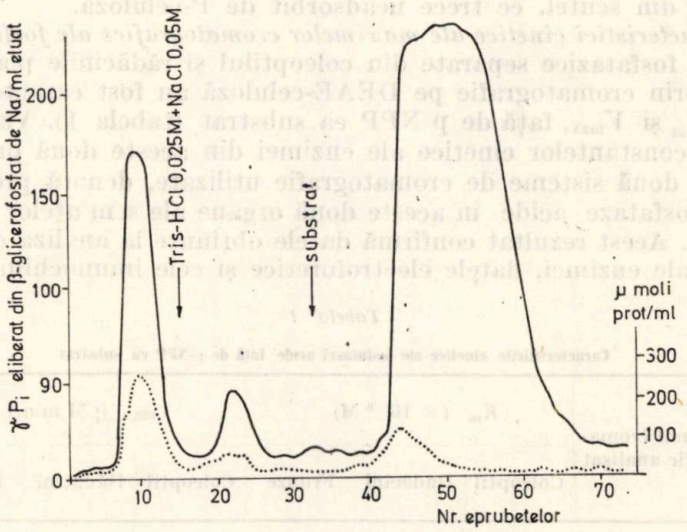


Fig. 3. — Cromatografia pe P-celuloză în tampon TRIS-HCl 0,025 M, pH 7,5 a fosfatazei acide din scutelul semințelor de porumb germinate.
—— γP_i eliberat din β-glicerofosfat de sodiu ca substrat, per ml. eluat
.... μmoli proteină/ml.

față de acest substrat de către preparatul de scuteli ne-a făcut să utilizăm acest substrat pentru eluția enzimei de pe P-celuloză. În plus, eluția cu pNPP nu este posibilă, datorită interferențelor de culoare produse de acest substrat la pH-ul alcalin folosit pentru cromatografierea enzimei.

Separarea electroforetică a maximelor cromatografice ale fosfatazei acide s-a urmărit în gel de agaroză, pentru a facilita compararea rezultatelor cu cele anterioare, obținute în cercetarea caracterului antigenic al enzimei (3).

Preparatele brute de coleoptil și rădăcini (fig. 4) evidențiază la electroforeza în gel de agaroză două fracțiuni : una mai slab electronegativă și mai puțin intensă ca activitate enzimatică, și a doua mai puternic electronegativă și cu activitate deosebit de intensă. Aspectul electroforetic similar al enzimei din aceste două organe constituie și el un argument pentru existența unei aceleiași fosfataze acide în coleoptilul și rădăcinile plantulelor de porumb.

Din figura 4 se observă că atît în tampon TRIS-HCl cît și în tampon acid acetic-acetat de sodiu este eluată numai fracțiunea puternic electronegativă a enzimei din preparatele parțial purificate de coleoptil și rădăcini. Fracțiunea mai slab electronegativă nu am regăsit-o în maximele adsorbite de DEAE-celuloză.

Scutelul seminţelor de porumb germinate evidenţiază în gel de agaroză trei fracţiuni electroforetice ale fosfatazei acide (fig. 5). Enzima eluată de pe P-celuloză cu tampon TRIS-HCl 0,025 M, conţinînd NaCl 0,05 M, evidenţiază la electroforeză fracţiunea 1 a extractelor brute, iar maximul fosfatazic eluat cu substrat prezintă fracţiunea electroforetică 2. Fracţiunea electroforetică 3 se regăseşte în maximul cromatografic al fosfatazei din scutel, ce trece neadsorbit de P-celuloză.

Caracteristici cinetice ale maximelor cromatografice ale fosfatazei acide. Maximele fosfatazice separate din coleoptilul şi rădăcinile plantulelor de porumb prin cromatografie pe DEAE-celuloză au fost caracterizate prin valorile K_m şi V_{max}, faţă de p-NPP ca substrat (tabela 1). Valorile apropiate ale constantelor cinetice ale enzimei din aceste două organe, ca şi între cele două sisteme de cromatografie utilizate, denotă prezenţa unei aceleiaşi fosfataze acide în aceste două organe ale seminţelor de porumb germinate. Acest rezultat confirmă datele obţinute la analiza diagramelor de eluţie ale enzimei, datele electroforetice şi cele imunochimice.

Tabela 1

Caracteristicile cinetice ale fosfatazei acide, faţă de *p*-NPP ca substrat

Maximul cromatografic analizat	K_m ($\times 10^{-6}$ M)			V_{max} (µ M min.)		
	Coleoptil	Rădăcini	Frunze	Coleoptil	Rădăcini	Frunze
în tampon TRIS-HCl	0,260	0,208	0,070	1,600	1,818	3,300
în tampon acid acetic-acetat de sodiu	0,250	0,210	0,090	1,780	1,920	3,900

Ne-am pus problema cercetării şi a caracteristicilor cinetice ale enzimei foliare, pentru a compara mai bine proprietăţile fosfatazei frunzelor cu cele ale enzimei din coleoptil şi rădăcini. Reamintim separarea fosfatazei acide din frunzele de porumb, pe DEAE-celuloză, în două maxime — T_1 şi T_2 în tampon TRIS-HCl — şi în trei maxime — A_1, A_2 şi A_3 — în tampon acid acetic-acetat de sodiu (5). Valorile K_m şi V_{max}, faţă de p-NPP ca substrat, evidenţiate de fosfataza foliară reţinută de schimbător însă sînt net diferite faţă de cele prezentate, cu acelaşi substrat, de fosfataza coleoptilului şi rădăcinilor de porumb, separată pe DEAE-celuloză (tabela 1). Vitezele de scindare ale substratului sînt şi ele deosebite, mai mari în cazul fosfatazei din frunze, comparativ cu enzima plantulelor. Menţionăm că valori ale K_m de acelaşi ordin de mărime cu cele stabilite de noi au fost găsite în cazul pirofosfatazei acide activate de Zn^{2+} şi al pirofosfatazei alcaline activate de Mg^{2+} din frunzele de porumb (16).

Caracteristici imunochimice ale maximelor cromatografice ale fosfatazei acide din coleoptil, rădăcini şi scutel de porumb. Caracterul antigenic al fosfatazei acide din extractele brute ale formaţiunilor şi organelor porumbului, în primele etape de creştere, a constituit obiectul unor cercetări anterioare (3). Aceste studii au relevat existenţa fosfatazei foliare şi în seminţele negerminate şi germinate.

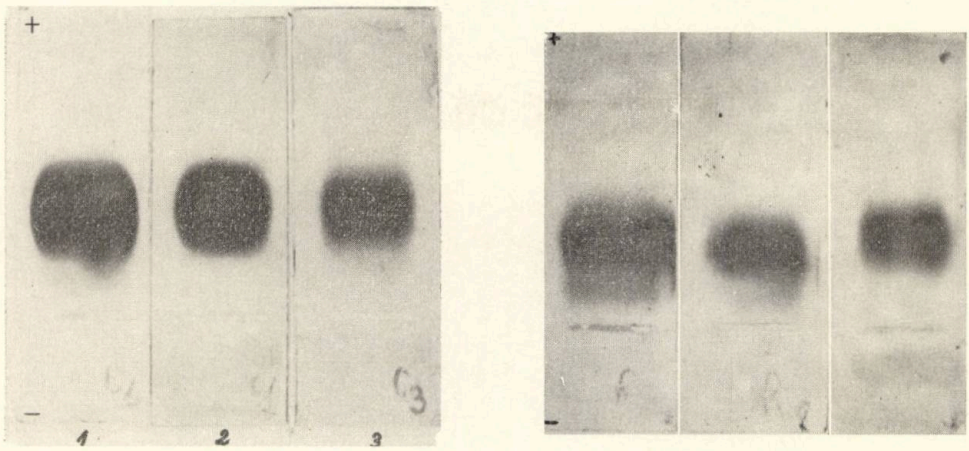


Fig. 4 — Separarea electroforetică în gel de agaroză a fosfatazei acide din coleoptilul (a) şi rădăcinile (b) plantulelor de porumb

1. extractul brut 2. maximul fosfatazic adsorbit în tampon TRIS-HCl 3. maximul fosfatazic adsorbit în tampon acid acetic-acetat de sodiu.

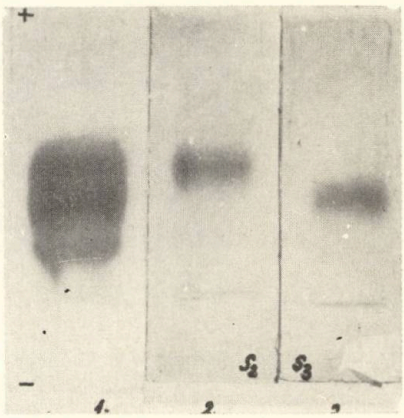
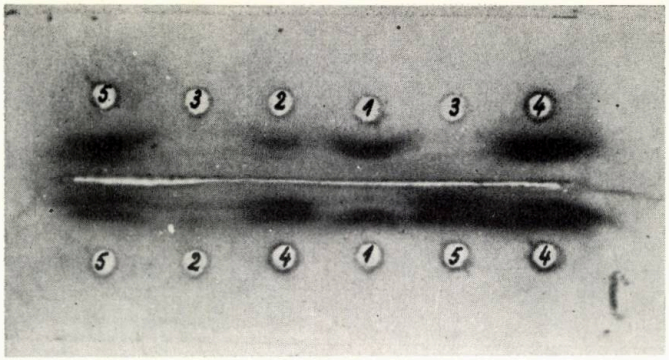
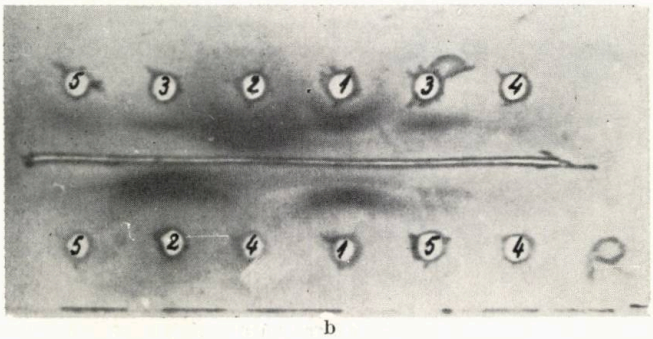


Fig. 5 — Separarea electroforetică în gel de agaroză a fosfatazei acide din scutelul semințelor de porumb germinate.

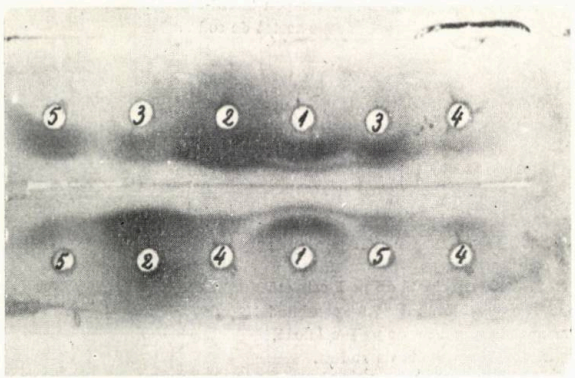
1. extractul brut 2. fosfataza eluată de pe P-celuloză cu tampon TRIS-HCl 0,025 M, pH 7,5 conținînd NaCl 0,05 M. 3. fosfataza eluată de pe P-celuloză, cu substratul (β-glicerofosfat de sodiu).



a



b



c

Fig. 6 — Dubla difuzie după Ouchterlony a fosfatazei acide din coleoptilul (a), rădăcinile (b) și scutelul (c) semințelor de porumb germinate. S-a folosit un ser imun anti-frunză de porumb

a) 1. preparat proteic brut din frunzele de porumb 2. preparat proteic brut din coleoptilii de porumb 3. maximul fosfatazic din coleoptili, reținut de DEAE-celuloză în tampon TRIS-HCl 4. maximul fosfatazic din coleoptili, ce trece nereținut de DEAE-celuloză în tampon acid acetic-acetat de sodiu 5. maximul fosfatazic din coleoptili, reținut din DEAE-celuloză în tampon acid acetic-acetat de sodiu

b) 1. preparat proteic brut din frunzele de porumb 2. preparat proteic brut din rădăcinile de porumb 3. maximul fosfatazic din rădăcini, reținut de DEAE-celuloză în tampon TRIS-HCl 4. maximul fosfatazic din rădăcini, ce trece neadsorbit de DEAE-celuloză în tampon acid acetic-acetat de sodiu 5. maximul fosfatazic din rădăcini, adsorbit de DEAE-celuloză în tampon acid acetic-acetat de sodiu.

c) 1. preparat proteic brut din frunzele de porumb 2. preparat proteic brut din scuteli 3. maximul fosfatazic ce trece neadsorbit de P-celuloză în tampon TRIS-HCl 0,025 M 4. maximul fosfatazic eluat cu NaCl 0,05 M în tampon TRIS-HCl 0,025 M de pe P-celuloză. 5. maximul fosfatazic eluat cu β-glicerofosfat de sodiu

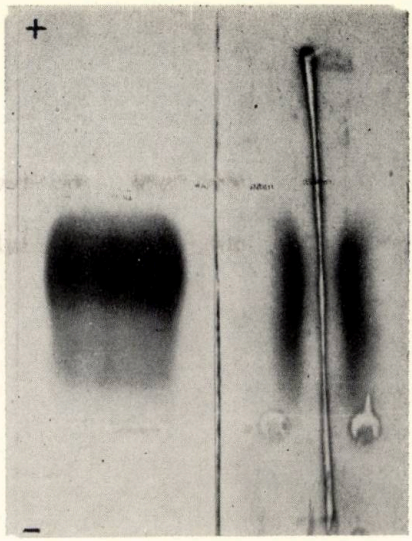


Fig. 7 — Electroforeza și imunoelectroforeza, în reacție omologă, a preparatului proteic brut din frunzele de porumb.

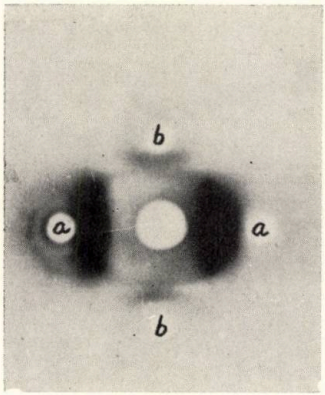


Fig. 8 — Dubla difuzie după Ouchterlony a fosfatazei acide din scutelul semințelor de porumb germinate (a) și din primele frunze (b), față de serul imun antifrunză.

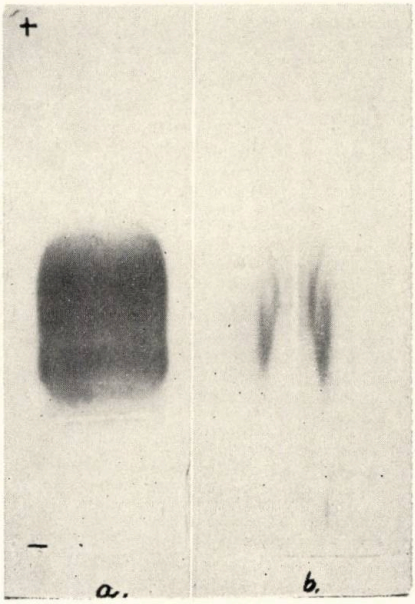


Fig. 9 — Electroforeza preparatului proteic brut (a) din scutelul semințelor de porumb germinate și imunoelectroforeza (b) față de serul antifrunză.

Metoda de azo-cuplare utilizată în lucrarea de față este mult mai sensibilă comparativ cu tehnica Gomori, folosită în cercetările anterioare (3). Astfel, preparatul proteic brut din frunze evidențiază la dubla difuzie după Ouchterlony, în reacție omoloagă, o singură linie de precipitare cu activitate fosfatazică (3). Aceeași reacție conturează, prin metoda azo-cuplării, trei linii de precipitare cu activitate fosfatazică, și anume una cu o intensitate scăzută a activității enzimatice, situată lîngă șanțul cu anticorpi, și două puternice, apropiate între ele, situate spre godeul cu antigene (fig. 6). Și rezultatele observate la imunoelectroforeză, realizată în aceleași condiții experimentale ca și electroforeza, diferă în funcție de metoda de relevare. Astfel, folosind tehnica Gomori, imunoelectroforeza preparatului brut din frunze contura o singură linie de precipitare cu activitate fosfatazică acidă, ce cuprindea cele două fracțiuni electroforetice puternic electronegative ale enzimei. Cu această metodă nu s-a putut vizualiza o linie de precipitare corespunzătoare fracțiunii electroforetice slab electronegative a fosfatazei foliare (3). Metoda de azo-cuplare a permis însă evidențierea și a celei de-a doua izoenzime prezente în frunze (fig. 7). Rezultatele obținute arată că frunzele de porumb conțin deci două izoenzime ale fosfatazei acide, diferite din punct de vedere antigenic, care la dubla difuzie, apar sub forma a trei linii de precipitare cu activitate fosfatazică. Acest rezultat atestă prezența unei izoenzime a fosfatazei acide foliare sub două forme moleculare ce diferă prin coeficienții de difuzie în gel și prin mobilitatea electroforetică.

În lucrarea de față s-a utilizat același ser imun, antifrunză de porumb, folosit anterior, pentru a cerceta caracterul antigenic al maximelor cromatografice ale fosfatazei acide din coleoptilul, rădăcinile și scutelul semințelor de porumb germinate. Preparatele brute de coleoptil și rădăcini prezintă la dubla difuzie după Ouchterlony, față de serul antifrunză, o reacție de identitate cu două din liniile de precipitare ale fosfatazei frunzelor, și anume cu cele situate în apropierea șanțului cu antiser (fig. 6 a și b).

Maximele fosfatazice separate din coleoptilii de porumb prin cromatografia pe DEAE-celuloză conturează, față de serul antifrunză, ambele linii de precipitare cu activitate fosfatazică, indiferent de soluția tampon folosită pentru cromatografie.

Fracțiunile cromatografice ale fosfatazei acide din rădăcini prezintă în tampon TRIS o singură linie de precipitare, comună cu linia din apropierea șanțului cu antiser prezentată de extractul de frunză; fosfataza adsorbită în tampon acetat conturează — analog coleoptilului — ambele linii de precipitare cu activitate enzimatică, identice din punct de vedere antigenic cu liniile din apropierea șanțului cu antiser relevate de extractul de frunze. Remarcăm modificarea raportului relativ de intensitate a activității fosfatazice a liniilor de precipitare conturate, în funcție de sursa enzimei și de maximul analizat. Deci, coleoptilii și rădăcinile plantulelor de porumb conțin ambele izoenzime ale fosfatazei acide foliare, fiecare din acestea sub o singură formă moleculară.

Fosfataza acidă din preparatele brute de scutel prezintă la dubla difuzie după Ouchterlony, față de serul antifrunză, două linii de precipitare cu activitate enzimatică, ambele evidențiind o identitate antigenică cu izoenzimele foliare situate lîngă șanțul cu antiser (fig. 8). Maximul

cromatografic separat de pe P-celuloză cu NaCl 0,05 M în tampon TRIS-HCl 0,025 M prezintă o singură linie de precipitare cu activitate enzimatică, iar maximul eluat cu substratul şi fracţiunea neadsorbită prezintă fiecare cîte două linii de precipitare cu activitate enzimatică, toate evidenţiind o reacţie de identitate cu izoenzima situată lîngă şanţul cu antiser (fig. 6c).

Imunoelectroforeza preparatelor brute din scutel faţă de serul antifrunză (fig. 9) relevă două linii de precipitare cu activitate enzimatică; una corespunde fracţiunilor electroforetice 1 şi 2, a doua, fracţiunii electroforetice 3. Aceasta arată că în scutel există tot două izoenzime ale fosfatazei acide, care se găsesc şi în frunză.

CONCLUZII

1. — Coleoptilul şi rădăcinile plantulelor de porumb conţin o aceeaşi fosfatază acidă. Profilele de eluţie similare de pe DEAE-celuloză, specificităţile de substrat similare, enzimogramele asemănătoare şi valorile K_m şi V_{max} faţă de *p*-NPP apropiate constituie fapte ce susţin această concluzie.

2. — Enzima din plantulele de porumb prezintă particularităţi faţă de fosfataza foliară, fapt ce reiese din prezenţa pe enzimograme a unui număr mai scăzut de forme moleculare, din eluţia enzimei la valori diferite de concentraţii ale gradientului, din specificitatea de substrat diferită şi din valorile deosebite ale constantelor cinetice K_m şi V_{max}, faţă de *p*-NPP ca substrat.

3. — Din punct de vedere imunochimic s-a stabilit că plantula de porumb conţine ambele izoenzime ale fosfatazei acide foliare, dar fiecare sub o singură formă moleculară (la frunză izoenzima fosfatazică cu activitate puternică se găsea sub două forme moleculare); scutelul seminţei în perioada germinării conţine ambele izoenzime ale fosfatazei frunzei şi plantulei.

4. — Rezultatele noastre arată că izoenzimele fosfatazei acide se menţin aceleaşi în cursul primelor etape de dezvoltare ontogenetică a porumbului putînd fi prezente sub una sau mai multe forme moleculare.

Autoarea mulţumeşte pe această cale tov. dr. Victoria Alexandrescu pentru sprijinul preţios dat în elaborarea acestei lucrări.

Prezentat la redacţie la 6 aprilie 1974

Departamentul de biochimie
Institutul de ştiinţe biologice Bucureşti

CHROMATOGRAPHIC SEPARATION AND ELECTROPHORETIC, KINETIC AND IMMUNOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE MAIZE GERMINATED SEED ACID PHOSPHATASE

SUMMARY

Maize seedling and roots contain the same acid phosphatase. This conclusion is supported by the following similar properties of the seedling and root enzyme: elution patterns from DEAE-cellulose columns, sub-

strate specificity, electrophoretic patterns and K_m and V_{max} values, with p-nitrophenyl phosphate as substrate. However, the seedling enzyme has particular properties as compared with the leaf one : a decreased number of molecular forms electrophoretically evinced, distinct gradient concentrations used for the elution of the enzyme, different substrate specificities and dissimilar K_m and V_{max} values, with p-nitrophenyl phosphate as substrate. Immunochemical study revealed that maize seedling contains both leaf phosphatase isoenzymes, each of them under only one molecular form ; these phosphatase isoenzymes were present in the germinated scutellum as well.

Our results evince the maintaining of acid phosphatase isoenzymes in the first developmental stages of maize ; these could be present, however, under one or more molecular forms.

BIBLIOGRAFIE

1. Victoria Alexandrescu, Doina Popov, Rev. roum. Biochim., *6*, 105 (1969).
2. Doina Popov, St. cerc. biochim., *12*, 377 (1969).
3. Victoria Alexandrescu, Doina Popov, Rev. roum. Biochim., *10*, 7 (1973).
4. Victoria Alexandrescu, Doina Popov, St. cerc. biochim., *12*, 121 (1969).
5. Doina Popov, St. cerc. biochim., *16*, 185 (1973).
6. P. H. Matile, J. P. Balz, E. Semadeni, M. Jost, Z. Naturforsch., *20*, 639 (1965).
7. V. Jaaska, V. Jaaska, Eesti. Nsv. Tead. Acad. Toimetis. Biol., *17*, 274 (1968).
8. Y. Efron, Genetics, *65*, 575 (1970).
9. Y. Efron, Biochem. Genet., *5*, 33 (1971).
10. J. Eley, Biochemistry, *8*, 1502 (1969).
11. G. L. Miller, Ann. Chem., *31*, 964 (1959).
12. M. Dixon, E. C. Webb, *Enzymes*, Ed. Longmans, 1960, p. 21.
13. J. Sahulka, Biol. Plantarum, *11*, 442 (1969).
14. R. C. Staples, W. J. McCarthy, Science, *149*, 1248 (1965).
15. P. G. G. Dean, S. R. Willetts, J. E. Blanch, Analyt. Biochem., *41*, 344 (1971).
16. V. L. Bennett, D. L. Ristrophe, J. J. Hamming, L. G. Butler, Biochim. Biophys. Acta, *293*, 232 (1973).

ST. CERC. BIOCHIM., 17, 3, 297–302 (1974)

TESTAREA VALORII BIOLOGICE A FOSFATULUI DICALCIC PE ŞOBOLANI

GH. SĂLĂJAN, O. POPA, V. TĂMAŞ, V. DANKANITS şi D. JOCA

Rezumat. — Prin administrarea fosfatului dicalcic produs de Combinatul chimic Făgăraş, în hrana şobolanilor, s-au înregistrat sporuri superioare în greutate şi o mai bună valorificare a hranei, în comparaţie cu făina de oase, ca urmare a unei mai bune digestibilităţi şi utilizări a fosforului, ceea ce înseamnă că fosfatul dicalcic este o sursă valoroasă de fosfor pentru animale.

Tehnologia de tip industrial şi semiintensivă a creşterii animalelor impune asigurarea unui furaj echilibrat în substanţe nutritive. Pe lîngă diferiţii compuşi organici (glucide, lipide, protide, vitamine şi enzime), nutreţurile trebuie să conţină şi substanţe minerale. Dintre macrobioelemente, o pondere şi un rol important revine calciului şi fosforului, întrucît aceste două elemente chimice participă atît la structura scheletului organismului, cît şi ca forme active, Ca^{2+} şi PO_4^{3-}, în numeroase procese biochimice. Pe de altă parte, un procent însemnat din aceste două elemente se elimină zilnic prin produsele animale date la exterior şi prin produsele de dejecţie (1).

Fosforul participă în măsură mai mare la activităţile vitale ale celulei, punînd probleme şi din punct de vedere al posibilităţilor de asigurare.

Furajele vegetale conţin fosfor, dar acesta fiind în mare măsură de natură fitică, este greu digestibil, astfel că se impune un aport suplimentar în acest macroelement, asigurat de regulă fie prin furaje de origine animală, fie prin făină de oase.

Creşterea însemnată a efectivelor de porci şi păsări face imposibilă echilibrarea hranei în fosfor pe baza surselor amintite, fapt care are consecinţe negative asupra sănătăţii şi producţiei animalelor. Această necesitate stringentă a producţiei zootehnice a determinat, în ultimii ani, numeroase cercetări pentru găsirea unor săruri fosfatice utilizabile în hrana animalelor (2, 3, 4, 5).

În scopul cunoaşterii efectului fosfatului dicalcic indigen (produs de Combinatul chimic din Făgăraş) asupra creşterii animalelor, ne-am propus să urmărim gradul de valorificare a acestui compus în hrana şobolanilor.

MATERIAL ŞI METODĂ

Cercetările s-au efectuat pe şobolani din linia Wistar, în două serii de experienţe. În fiecare experienţă s-au folosit cîte 3 loturi de cîte 5 animale (3 masculi şi 2 femele). În ambele serii de experienţe s-a administrat aceeaşi hrană (tabela 1.).

Tabela 1

Schema de experimentare și hrana administrată

Specificare	Lotul 1	Lotul 2	Lotul 3
— Structura hranei %			
Amidon pur-dextrinizat	58,0	58,6	58,0
Zahăr pur	10,0	10,0	10,0
Cazeină pură	18,0	18,0	18,0
Ulei de porumb	5,0	5,0	5,0
Celuloză pură	4,0	4,0	4,0
Sare de bucătărie	0,5	0,5	0,5
Zoofort [2])	1,0	1,0	1,0
Amestec de substanțe minerale[1])	0,5	0,5	0,5
Făină de oase	3,0	—	—
Fosfat dicalcic	—	1,8	3,0
Cretă furajeră	—	0,6	—
Total	100,00	100,00	100,00
Ca/100 g furaj (g)	1,089	0,834	0,972
P/100 g furaj (g)	0,513	0,330	0,549
Ca/P	2,1	2,5	1,8

1) 1 kg conține: vitamina A 9.900.000 U.I.; vitamina D_3 500.000 U.I. vitamina B_1 500 mg; vitamina B_2 2000 mg; pantotenat de calciu 4000 mg; vitamina P.P. 7000 mg; colină 7525 mg; vitamina B_{12} 7700 mg; penicilină 1250 mg; clortetraciclină 1250 mg; oxitetraciclină 1250 mg; diferența pînă la 1 kg drojdie furajeră.

2) 1 kg conține: carbonat de calciu 68,5 g; sulfat de magneziu 58,3 g; citrat de calciu 308,3 g; carbonat de magneziu 55,2; fosfat monoacid de calciu 112,8 g; sulfat de mangan 0,201 g; fosfat monoacid de potasiu 238,8 g; sulfat de cupru 0,078 g; clorură de potasiu 141,8 g; iodură de potasiu 0,041 g; fluorură de sodiu 0,507 g; sulfat de amoniu și aluminiu 0,090 g; Fe III amoncitrat 15,383 g.

La lotul 1 (martor, M), fosfatul s-a asigurat prin făină de oase, la lotul 2 prin fosfat dicalcic, stabilindu-se un raport optim Ca/P (prin suplimentarea cu cretă furajeră), iar la lotul 3 prin fosfat dicalcic administrat în aceeași proporție ca și făina de oase la lotul 1).

Prima serie de experiențe a durat 45 de zile (de la 13. I, cînd șobolanii aveau 40 zile, pînă la 27. II .1973) și a avut ca scop stabilirea influenței fosforului din sursele arătate asupra creșterii, respectiv a sporului mediu zilnic și a consumului specific.

A doua serie de experiențe a durat 7 zile (de la 10. III, cînd șobolanii aveau 80 zile, pînă la 16. III. 1973) și a avut ca obiectiv stabilirea digestibilității, a bilanțului calciului și fosforului, a sporului mediu zilnic și a consumului specific. În cursul perioadelor experimentale s-au stabilit: cantitatea de hrană ingerată și cantitatea de fecale și urină eliminate.

Pentru determinarea fosforului și a calciului, materialul de analizat a fost dezagregat în prealabil cu un amestec de acid sulfuric — perhidrol (6). Fosforul a fost determinat pe cale colorimetrică, prin metoda vanado-molibdenică (7), iar calciul pe cale complexometrică, prin titrare cu complexon III în prezență de murexid (6).

Atît experiențele de efect productiv cît și cele de bilanț au fost efectuate în cuști individuale de metabolism, urmărindu-se toate ele-

mentele cercetate, pe indivizi. Datele obținute s-au prelucrat statistic, prin metoda analizei varianței, cu aplicarea testului „*t*" al lui Student.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Rezultatele analizei chimice efectuate asupra făinii de oase, a fosfatului dicalcic și a cretei furajere sînt redate în tabela 2.

Tabela 2

Compoziția chimică brută a făinii de oase, a fosfatului dicalcic și a cretei furajere

	(%)				
	S.U.	Cenușă	Ca	P_2O_5	P
Făină de oase	99,88	99,87	36,30	39,20	17,09
Fosfat dicalcic	97,85	94,78	32,40	42,00	18,31
Cretă furajeră	99,80	98,33	42,00	—	—

Analizînd rezultatele privind sporul în greutate și consumul de hrană din prima serie de experiențe (tabela 3), se constată că la loturile 2 și 3, la care fosforul s-a asigurat prin fosfatul dicalcic, sporul mediu zilnic în greutate a crescut cu 33,30% și, respectiv, 74,30%, iar consumul de hrană pe 1 kg spor a scăzut cu 43,70% și, respectiv, 53,80% în com-

Tabela 3

Sporul în greutate și consumul de hrană la șobolanii din seria I de experiențe

Specificare		Lotul		
		1(M)	2	3
Greutatea medie corporală :				
— Inițială		39,00	38,60	39,00
— Finală		57,50	61,62	69,67
Spor mediu zilnic	(g)	0,39±0,60	0,52±0,10	0,68±0,08
Spor mediu zilnic	(%)	100,00	133,30	174,30
Diferența față de M	(g)	—	0,13±0,12	0,29±0,09
Diferența față de M	(%)	—	33,30	74,30
Semnificația diferenței față de M	(p %)	—	>0,05	<0,05
Consum mediu zilnic	(g)	6,96	7,84	6,14
Consum / 1 g spor	(g)	20,78±2,20	12,20±1,70	9,62±0,9
Consum / 1 g spor	(%)	100,00	56,30	46,20
Diferența față de M	(g)	—	−8,58±2,80	−11,16±2,50
Diferența față de M	(%)	—	−43,70	−53,80
Semnificația diferenței față de M	(p %)	—	<0,05	<0,01

rație cu lotul martor, diferențele fiind semnificative. Aceste rezultate arată că fosfatul dicalcic este capabil să asigure organismului animal atît fosforul cît și calciul, cel puțin la nivelul făinii de oase.

Rezultatele obținute în seria a doua de experiențe (tabela 4) concordă cu cele obținute în seria întîi de experiențe și atestă faptul că fosfatul dicalcic, ca sursă de fosfor și calciu (cazul loturilor 2 și 3,) realizează un spor mediu zilnic superior și o mai bună valorificare a hranei, în comparație cu făina de oase de la lotul martor.

Tabela 4

Sporul în greutate și consumul de hrană la șobolanii din seria a II-a de experiențe

Specificare		L o t u l		
		1(M)	2	3
Greutatea medie corporală :	(g)			
— Inițială		79,00	84,20	80,70
— Finală		83,87	93,76	94,90
Spor mediu zilnic	(g)	1,07±0,42	1,37±0,21	2,03±1,06
Spor mediu zilnic	(%)	100,00	128,97	189,72
Diferența față de M	(g)	—	0,30	0,96
Diferența față de M	(%)	—	28,97	89,72
Semnificația diferenței față de M	(p %)	—	<0,05	>0,05
Consum mediu zilnic	(g)	10,59	8,94	9,55
Consum / 1 g spor	(g)	9,90+1,91	8,13+1,92	5,21+0,83
Consum / 1 g spor	(%)	100,00	82,12	52,63
Diferența față de M	(g)	—	−1,77	−4,69
Diferența față de M	(%)	—	−17,88	−47,37
Semnificația diferenței față de M	(p%)	—	>0,05	<0,05

Creșterea sporului mediu zilnic în greutate și reducerea consumului de hrană pe un g spor, sub influența fosfatului dicalcic, față de făina de oase, se datorează unei asigurări mai bune a organismului cu ioni de calciu și cu ioni de fosfat.

În seria a doua de experiențe s-au efectuat și determinări de digestibilitate și de bilanț al calciului și fosforului. Cantitatea de furaj ingerată și conținutul în calciu și fosfor pe g furaj ingerat, pe g substanță uscată din fecale și pe urină totală recoltată în cele 7 zile, de la fiecare animal, sînt redate în tabela 5.

Datele cu privire la digestibilitatea calciului și fosforului sînt prezentate în tabela 6.

Digestibilitatea fosfatului dicalcic, (cazul loturilor 2 și 3) este mai ridicată decît a făinii de oase (cazul lotului 1 (M)). Se poate aprecia că atît calciul cît și fosforul din fosfatul dicalcic, indiferent de raportul Ca/P, au fost mai bine absorbite.

Ca urmare a unei mai bune digestibilități a calciului și fosforului din fosfatul dicalcic, bilanțul acestora în organism are valori mai mari decît în cazul făinii de oase, ceea ce înseamnă că din calciul și fosforul ingerat prin fosfatul dicalcic s-a reținut în corp o proporție mai mare decît în cazul făinii de oase.

Pe baza conținutului brut și al coeficienților de digestibilitate s-a stabilit conținutul digestibil de Ca și P la 1 kg făină de oase și fosfat

Tabela 5

Consumul de hrană şi conţinutul de Ca şi P al hranei, fecalelor şi urinei pe timpul bilanţului

Lotul	Nr. şobolanului	Furaj ingerat g	Ca/1 g furaj mg	P/1 g furaj mg	S.u. din fecale g	Ca/g S.u. din fecale mg	P/g S.u. din fecale mg	Ca eliminat prin urină mg	P mg
	1	51,0	15,0	8,22	13,20	44,8	22,80	22,0	6,10
	2	95,5	15,0	8,22	3,30	32,0	18,10	30,0	22,50
1	3	Eliminat							
	4	55,0	15,0	8,22	15,22	42,5	21,80	28,0	6,0
	5	72,0	15,0	8,22	20,19	45,5	22,24	15,0	15,0
	6	67,0	11,3	6,33	17,31	38,0	18,20	21,0	3,5
	7	64,5	11,3	6,33	19,21	32,6	15,70	26,0	4,4
2	8	56,5	11,3	6,33	8,29	54,0	30,50	25,0	1,7
	9	61,5	11,3	6,33	8,10	61,9	32,20	13,0	2,8
	10	63,5	11,3	6,33	7,28	65,0	37,40	14,0	1,4
	11	69,0	12,6	8,30	13,47	47,0	32,80	8,0	16,50
	12	61,7	12,6	8,30	11,64	52,5	31,20	15,0	14,40
3	13	27,0	12,6	8,30	4,74	41,6	27,20	7,0	14,30
	14	57,0	12,6	8,30	11,48	53,5	30,40	5,0	17,40
	15	62,0	12,6	8,30	8,82	55,4	43,60	3,0	14,60

Tabela 6

Coeficienţii de digestibilitate, de utilizare a părţii digestibile şi bilanţul calciului şi fosforului

Lotul	Coeficienţii de digestibilitate (%)		Utilizat din partea dig. (%)		Reţinut în corp din partea ingerată (%) (bilanţul)	
	Ca	P	Ca	P	Ca	P
1(M)	21,88±2,37	26,12±0,93	88,59±1,70	91,84±1,80	18,95±2,17	23,66±1,37
2	23,79±4,28	29,27±1,42	85,59±3,97	97,56±0,59	23,21±5,50	28,58±1,58
3	28,50±5,06	29,20±3,42	95,37±0,84	87,49±0,95	29,61±5,34	26,67±2,80

dicalcic (tabela 7), pentru a se putea utiliza datele în practică. Rezultatele atestă conţinutul mai mare de fosfor digestibil la fosfatul dicalcic, confirmînd valoarea furajeră a acestuia.

Tabela 7

Conţinutul brut şi digestibil de Ca şi P (în g/kg)

Furajul	brut		digestibil	
	Ca	P	Ca	P
Făină de oase	363,00	170,90	85,77	44,63
Fosfat dicalcic	324,00	183,10	79,23	53,47

Făcîndu-se observaţii periodice asupra sănătăţii animalelor din ambele serii de experienţe, nu s-au constatat simptome clinice de îmbol-

năvire și nici cazuri de mortalitate la loturile care au avut în hrană fosfat dicalcic, ceea ce denotă că acest produs nu conține substanțe toxice.

CONCLUZII

1. Fosfatul dicalcic cercetat are un conținut de fosfor brut mai mare și un conținut de calciu brut ceva mai scăzut față de făina de oase, și nu conține substanțe toxice pentru animale.

2. În comparație cu făina de oase, fosforul și calciul din fosfatul dicalcic sînt mult mai digestibile, fapt care determină reținerea în corp a unui procent mai mare de calciu și de fosfor și, deci, o utilizare mai bună a acestora.

3. Fosfatul dicalcic, prin conținutul mai ridicat în fosfor, prin digestibilitatea și utilizarea lui mai bună de către organism, asigură o mai bună creștere a animalelor și contribuie la îmbunătățirea valorificării hranei, în comparație cu făina de oase, motiv pentru care îl recomandăm producției.

Prezentat la redacție
la 15 februarie 1974

Disciplina de alimentația animalelor domestice și disciplina de biochimie
Institutul agronomic Cluj

TESTING OF BIOLOGICAL VALUE OF DICALCIUM PHOSPHATE ON RATS

SUMMARY

By adding dicalcium phosphate (produced by Combinatul chimic Făgăraș) in the diet of rats, higher weight gain and feed conversion were obtained as compared to bone meal, subsequently to an improved phosphorus digestibility and conversion, which proved dicalcium phosphate to be a valuable phosphorus source in animal nutrition.

BIBLIOGRAFIE

1. Al. Marinescu, Ferma și I.A.S., Nr. **10**, 27 (1973).
2. G. Norris, N. Y. Heuser, J. Nutr., **52**, 115 (1954).
3. P. Mather, V. Haldaway, J. Dairy, Sci., **32**, 228 (1949).
4. F. B. Morrison, Feeds and Feeding, Clinton, Iowa, 1959, p. 100.
5. A. Davis, F. Outler, J. Anim. Sci., **12**, 913 (1953).
6. O. B. Gasparian, Izvestia Akademii Nauk Aramianskoi S.S.S.R. (Erevan), **14**, 89 (1961).
7. W. Eberhardt, Landw. Forsch. **14**, 30 (1961).

ST. CERC. BIOCHIM., 17, 3, 303–306 (1974)

COMPARAȚIE ÎNTRE DOUĂ METODE DE DOZARE A GLUCOZEI SANGUINE

MARGARETA ȘERBAN și FLORICA IONESCU-STOIAN

Rezumat. — Se studiază comparativ două metode pentru determinarea nivelului glucozei sanguine : metoda cu *o*-toluidină și cea enzimatică bazată pe reacția glucoxidază-peroxidază și folosirea cromogenului *p*-aminodimetilanilina (set de reactivi „Dr. I. Cantacuzino").
Din analiza statistică a rezultatelor obținute se constată o bună concordanță între cele două metode. Testul enzimatic elaborat în Institutul „Dr. I. Cantacuzino" poate fi extins pe scară largă în laboratoarele de biochimie clinică din țara noastră.

Determinările concentrației de glucoză sanguină, efectuate în scopul investigării tulburărilor metabolismului glucidic, reprezintă o proporție apreciabilă din volumul de lucru zilnic al unui laborator de biochimie clinică.

De aceea, tendința actuală în aceste laboratoare este aplicarea metodelor celor mai simple, rapide și precise, care să poată fi executate atît manual — în cazul determinărilor de mare serie — cît și adaptate la aparatura analitică automatizată.

În ultimii ani, așa cum rezultă din literatura de specialitate [1], [2], [3], s-au făcut progrese însemnate în selectarea și perfecționarea metodologiei de dozare a glucozei sanguine. În acest sens, s-au impus ca tehnici de rutină pentru evaluarea glicemiei diverse variante ale metodei cu *o*-toluidină [2], [4], [5], aceste metode fiind preluate și adaptate și la sistemele automatizate de dozare (TEHNICON, LKB etc).

Cu toate avantajele menționate, aceste metode prezintă și unele neajunsuri, care se referă în special la lipsa de specificitate, în determinare, în afara concentrației reale a glucozei sanguine, fiind incluse și alte componente (alte glucide reducătoare, acid ascorbic, glutation etc.). Aceste inconveniente au condus la elaborarea de metode enzimatice bazate pe acțiunea specifică a unor enzime asupra glucozei. A fost folosit în acest scop fie sistemul enzimatic hexokinază-glucozo-6-fosfatdehidrogenază [3], utilizat mai puțin în analizele de mare serie, dat fiind costul mai ridicat al reactivilor necesari, fie sistemul enzimatic glucoxidază-peroxidază (GOD—POD), care se practică în numeroase variante metodologice [1], [4], [6], [7].

Principiul metodei enzimatice cu GOD—POD este următorul : glucoxidaza (GOD) catalizează oxidarea specifică a glucozei la acid gluconic :

$$\text{glucoză} + O_2 + H_2O \overset{\text{GOD}}{\rightleftharpoons} \text{acid gluconic} + H_2O_2.$$

Peroxidul de hidrogen format în reacția primară de oxidare a glucozei este descompus cu ajutorul peroxidazei (POD); oxigenul eliberat

oxidează, la rîndul lui, un cromogen (adăugat la mediul de reacţie), care trece în derivatul său colorat. Întensitatea culorii obţinute este o funcţie directă a glucozei oxidate. Cromogenii folosiţi sînt *o*-dianisidina, 2,2'-azino-di-3-etilbenziazoliu-6-sulfonic acid (ABTS), 4-aminofenazina în prezenţa fenolului [5].

Elaborarea în Institutul „Dr. I. Cantacuzino" a unei metode enzimatice pentru dozarea glucozei sanguine, cu folosirea enzimelor (GOD şi POD) purificate în acest institut, creează posibilitatea extinderii şi în laboratoarele clinice din ţara noastră a acestui test de mare specificitate. Originalitatea metodei constă în folosirea substanţei cromogene *p*-aminodimetilamina (PADMA), ca acceptor al oxigenului eliberat în reacţiile enzimatice [6].

În lucrarea de faţă ne-am propus verificarea setului de reactivi „Dr. I. Cantacuzino" pentru determinarea glucozei sanguine şi compararea rezultatelor cu cele obţinute prin metoda cu *o*-toluidină, practicată în laboratorul de biochimie clinică al Institutului de medicină internă.

MATERIAL ŞI METODE

S-a determinat concentraţia glucozei sanguine la 100 subiecţi, folosind următoarele metode:

Metoda Dubowsky cu o-toluidină [2], în care reactivul cromogen este format din: *o*-toluidină 0,56 M, tiouree $1{,}31 \cdot 10^{-2}$ M şi acid acetic glacial 16 M. Recoltarea sîngelui s-a făcut pe fluorură de sodiu, iar pentru deproteinizare s-a folosit acid tricloracetic 3%.

Metoda enzimatică (*set de Reactivi „Dr. I. Cantacuzino"*) [6], în care preparatul enzimatic GOD — POD liofilizat se dizolvă în tampon acetat 50 mM, pH = 4,8. Cromogenul — *p-aminodimetil-amina* (PADMA) — se adaugă la soluţia enzimatică, obţinîndu-se soluţia reactiv, în care concentraţia componenţilor este următoarea: GOD = 200 μg/ml; POD = 50 μg/ml; PADMA = 147 μg/ml. Soluţia deproteinizantă folosită este acetatul de uranil 3,8 mM. Sîngele se recoltează pe heparină.

Rezultatele obţinute au fost prelucrate statistic, după cum urmează: pentru compararea celor două metode s-a calculat testul diferenţei între medii, coeficientul de corelaţie lineară între perechile de valori ale celor două şiruri, precum şi ecuaţia dreptei de regresie a aceloraşi perechi de valori. Pentru analiza reproductibilităţii celor două metode, serul de testat a fost împărţit în 10 eşantioane dozate separat. S-a calculat media determinărilor, abaterea standard şi coeficientul de variaţie.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Analizînd testul diferenţei între medii, se constată o apreciere foarte mare între valorile medii obţinute prin cele două metode, „*d*" avînd o valoare nesemnificativă de 0,42 mg/100 ml (valoarea medie pentru metoda enzimatică este 95,1 mg/100 ml, iar valoarea medie pentru metoda cu *o*-toluidină este de 94,68 mg/100 ml). Ecuaţia dreptei de regresie este

$y = 0{,}69\ x + 29{,}1$ (fig. 1). Coeficientul de corelație „r" între perechile de valori ale celor două șiruri este de 0,66, ceea ce reprezintă o corelație satisfăcătoare între metodele comparate.

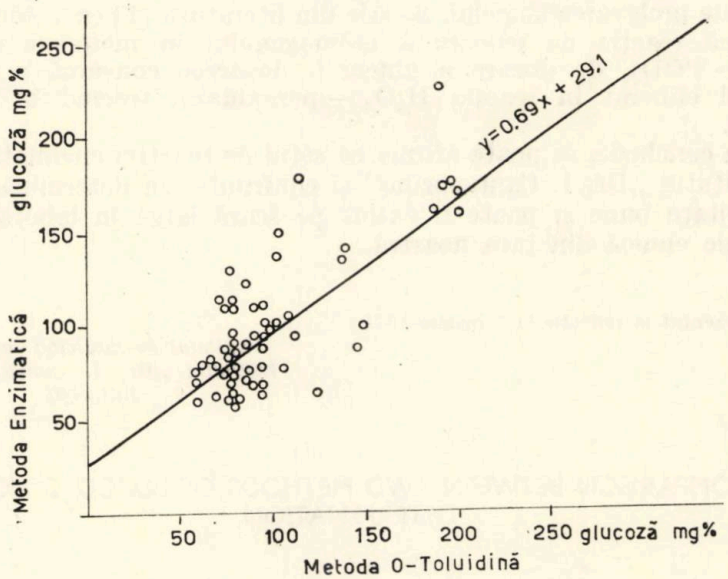


Fig. 1 — Norul statistic și dreapta de regresie pentru cele două metode studiate. Pe abscisă sînt trecute valorile glucozei sanguine obținute prin metoda cu o-toluidină, iar pe ordonată cele obținute prin metoda enzimatică.

În tabela 1 prezentăm valorile medii, abaterile standard și coeficienții de variație în probele de reproductibilitate (s-au folosit pool-uri de seruri diferite).

Tabela I

Valorile medii, abaterile standard și coeficienții de variație în probele de reproductibilitate

Metoda	Valoarea medie mg/100 ml	Abaterea standard s	Coeficient de variație c.v.
o-toluidină	82,4	±0,84	1%
GOD—POD PADMA	109,75	±0,88	0,8%

Pentru ambele metode s-a folosit controlul determinărilor cu seruri liofilizate standard (firma HYLAND), cu concentrații diferite de glucoză. Rezultatele obținute prin metoda cu *o*-toluidină cît și prin cea enzimatică s-au încadrat în limitele admise, indicate în fișele însoțitoare ale flacoanelor de ser standard.

Valori neconcordante între cele două metode, am găsit în cîteva cazuri, în care cifra obţinută prin metoda enzimatică este mult mai mică decît cea găsită prin metoda cu *o*-toluidină. La aceşti subiecţi, nu se păstrase indicaţia de întrerupere a administrării de vitamină C sau de tetraciclină (care este stabilizată cu acid ascorbic), cu cel puţin 48 ore înainte de prelevarea sîngelui. Se ştie din literatură [7] că acidul ascorbic împiedică reacţia de culoare a cromogenului în metodele enzimatice (GOD — POD), de dozare a glucozei, deoarece consumă o parte din oxigenul eliberat în reacţia H_2O_2 — peroxidază, trecînd în forma lui oxidată.

În concluzie, se poate afirma că setul de reactivi enzimatici produs de Institutul „Dr. I. Cantacuzino" şi confruntat în determinări de serie dă rezultate bune şi poate fi extins pe scară largă în laboratoarele de biochimie clinică din ţara noastră.

Prezentat la redacţie la 7 martie 1974

Institutul de medicină internă
Institutul „Dr. I. Cantacuzino"
Bucureşti

COMPARISON BETWEEN TWO METHODS OF BLOOD GLUCOSE DETERMINATION

SUMMARY

A comparative study is made of two methods for the determination of the blood glucose level: the method with o-toluidine and the enzymatic method which is based on the glucoxidase-peroxidase reaction and the use of the p-aminodimethylaniline as a chromogen (the "Dr. I. Cantacuzino" set of reagents)

The statistical analysis of the results obtained showed good agreement between the two methods. The enzymatic test elaborated in the "Dr.I. Cantacuzino" Institute may be extended on a wide scale to the laboratories of clinical biochemistry all over the country.

BIBLIOGRAFIE

1. J. Amon, Schweiz med. Wschr,, **100**, 1317 (1970).
2. K. M. Dubowsky, Clin. Chem., **8**, 215 (1962).
3. C. A. Pennock, D.Murphy, J. Sellers, K. J. Longdon, Clin. Chem. Acta, **48**, 193 (1973).
4. A. Dyvarinen, E. A. Nikkila, Clin. Chim. Acta, **7**, 140 (1962).
5. R. E. Wenk, R. J. Creno, V. Loock, J. B. Henry, Clin. Chem., **15**, 1162 (1969).
6. Florica Ionescu-Stoian, Rev. roum. Biochim., **11**, 25 (1974).
7. W. H. Werner, G. Rey, H. Wielinger, Z. Analyt. Chem., **252**, 224 (1970).

ST. CERC. BIOCHIM., 17, 3, 307–312 (1974)

LEGAREA COVALENTĂ A PEROXIDAZEI DE CH- şi AH-SEPHAROSE 4 B

HORST D. SCHELL şi MIRCEA A. MATEESCU

Rezumat. — Se descriu proprietăţile peroxidazei insolubilizate prin legarea ei covalentă de CH- şi AH-Sepharose 4 B în prezenţă de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimidă (EDC). În cazul cuplării peroxidazei de CH-Sepharose 4 B se obţine un preparat enzimatic cu o activitate enzimatică specifică reziduală de 60,6 %.
În cazul cuplării enzimei de AH-Sepharosă 4 B activitatea specifică reziduală este de 78 %. Se discută cauza acestor diferenţe în activitatea catalitică a preparatelor enzimatice insolubile obţinute.
Prin legarea covalentă de CH- şi AH-Sepharoză 4 B peroxidaza nu-şi modifică pH-ul optim de acţiune.
Preparatele obţinute îşi păstrează practic aceiaşi activitate şi după zeci de refolosiri consecutive.
Preparatele peroxidazei insolubilizate, uscate (după o prealabilă deshidratare blîndă în acetonă) şi reîmbibate, după o păstrare de 6 săptămîni la temperatura camerei mai prezintă o activitate specifică de peste 50 % din cea iniţială a enzimei insolubilizate.

Datorită multiplelor posibilităţi de aplicare în cercetarea ştiinţifică fundamentală şi în practică, enzimelor insolubilizate li se acordă în ultima vreme o atenţie deosebită [1] [2] [3]. Principalul lor avantaj constă, faţă de cele libere, mai ales în posibilitatea refolosirii lor repetate. După terminarea reacţiei ele pot fi uşor îndepărtate din mediul de incubare, prin simplă filtrare sau centrifugare şi refolosite — după o prealabilă spălare — la o nouă reacţie enzimatică. S-a constatat, totodată, că prin legarea de suporturi insolubile enzimele devin în general mai stabile în soluţii apoase, mai puţin sensibile la variaţii de temperatură şi de pH, iar cele proteolitice, rezistente faţă de autoproteoliză [4] [5] [6].

Dintre diferitele metode descrise pentru prepararea acestora, cele bazate pe legarea covalentă a macromoleculelor enzimatic active de suporturile insolubile sînt cele mai avantajoase şi mai des folosite în prezent.

În continuarea unei lucrări anterioare [7], unde am prezentat obţinerea şi proprietăţile unui preparat enzimatic insolubil extrem de activ, obţinut prin legarea covalentă a peroxidazei direct de molecula agarozei activate cu BrCN, în lucrarea de faţă prezentăm comportarea peroxidazei legate tot covalent de agaroză, dar nu direct de molecula ei, ci prin intermediul unor braţe hexametilenice. Era interesant de văzut ce efect are distanţarea moleculei peroxidazei de matricea suportului insolubil, cunoscut fiind rolul important pe care factorii sterici îl pot juca în activitatea biologică specifică a acestor conjugate macromoleculare (8). Am urmărit, totodată, dacă şi în ce mod se repercutează asupra proprietăţilor catalitice ale preparatului enzimatic insolubil modalitatea cuplării

peroxidazei de suportul insolubil, adică dacă legarea covalentă se realizează prin intermediul grupărilor ei aminice sau al celor carboxilice. Ne-am oprit în mod special asupra peroxidazei, deoarece ea prezintă interes nu numai pentru chimia analitică şi clinică, dar mai ales pentru chimia organică preparativă, la catalizarea reacţiilor de oxidare a unei întregi serii de compuşi, cu apă oxigenată.

În ultimul timp s-au mai descris preparate de peroxidază insolubilizată obţinute însă prin legarea enzimei de alte suporturi, cum ar fi CM-celuloza [9] [10] [11] sau AE-celuloza [11].

MATERIAL ŞI METODE

Izolarea şi cuplarea peroxidazei de CH- şi AH-Sepharoză 4 B. Peroxidaza s-a extras cu o soluţie de K_2HPO_4 0,1 M, la 4°C, din rădăcini de hrean, fin mărunţite, ţinînd seama de indicaţiile date de L.M. Shanon şi colab. [12]. Extractul obţinut, parţial purificat prin precipitări cu sulfat de amoniu şi gel-filtrare pe Sephadex G—50 medium, se foloseşte direct la cuplarea cu suportul insolubil, procedîndu-se astfel: 1 g CH- sau AH-Sepharoză 4 B, umflată şi spălată cu o soluţie 0,5 M de NaCl, se tratează cu 5 ml extrat de peroxidază (concentraţie proteică 16 mg/ml, activitatea enzimatică specifică 180 μM ascorbat oxidat/min/mg proteină, pH ajustat la 4,7) şi 40 mg clorhidrat de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimidă (EDC), dizolvat în 0,5 ml apă distilată. După o agitare electromagnetică de 6 ore la temperatura camerei, produsul de cuplare se filtrează pe o pîlnie Büchner, la trompa de apă şi se spală consecutiv, de 3—4 ori, cu o soluţie tampon de acid acetic-acetat (0,1 M, pH 4,1), apoi cu o soluţie tampon de borat (pH 8,6 + 1 M NaCl) şi în sfîrşit cu o soluţie de acid acetic-acetat (0,01 M, pH 4,5), pînă cînd filtratul nu mai prezintă activitate peroxidazică.

Determinarea activităţii enzimatice a peroxidazei libere şi legate. Se foloseşte metoda lui Brad şi colab. [13], introducînd într-o eprubetă 1 ml extract enzimatic sau 1 ml gel depus de agaroză cuplată cu peroxidază, 2 ml reactiv de benzidină (preparat după Bojarkin [14] prin dizolvare de 0,23 g benzidină în 3 ml acid acetic glacial, diluarea soluţiei cu apă distilată la aproximativ 100 ml, adăugarea de 6,8 g CH_3COONa. 3 H_2O şi completarea cu apă distilată pînă la 250 ml), 0,1 ml soluţie de acid ascorbic 1% şi, în cele din urmă, rapid, 1 ml soluţie 1% de H_2O_2 în tampon acid acetic-acetat (0,05 M, pH 4,7), considerînd momentul adăugării H_2O_2 momentul zero al reacţiei. Se cronometrează timpul, în secunde pînă la apariţia culorii albastre a benzidinei oxidate ceea ce are loc abia după oxidarea întregii cantităţi de acid ascorbic. Pentru determinarea capacităţii de refolosire a peroxidazei insolubilizate am modificat metoda după cum urmează: 1 ml gel depus de enzimă insolubilizată introdus într-o eprubetă se tratează cu un amestec format din 2 ml soluţie 1% de H_2O_2 şi 0,1 ml soluţie 1% de acid ascorbic şi se agită 10 — 12 sec (timp necesar pentru oxidarea ascorbatului, aflat din determinări prealabile) apoi se filtrează. Pe creuzetul filtrant rămîne enzima insolubilă, care după o prealabilă spălare este folosită într-o nouă reacţie. Pentru a verifica dacă într-adevăr întreaga cantitate de acid ascorbic a fost oxi-

dată, filtratul este adăugat unui amestec format din 2 ml reactiv de benzidină şi 1 ml extract de enzimă liberă. Apariţia instantanee a coloraţiei albastre, specifice a benzidinei oxidate, arată că întreaga cantitate de 1 mg de acid ascorbic a fost oxidată în timpul celor 10—12 sec, cît acesta a stat în contact cu enzima insolubilizată. În afara acestei testări în regim discontinuu, intercalîndu-se între două folosiri cîte o spălare, peroxidaza insolubilizată a fost testată şi în condiţiile unui regim de lucru continuu, mai îndelungat, procedîndu-se astfel: peste 1 ml gel depus de enzimă legată de suport şi introdus într-o coloană cromatografică se trece în flux continuu un amestec format dintr-o parte de soluţie de acid ascorbic 1% şi 10 părţi de H_2O_2 1%, reglînd viteza de scurgere astfel ca întreaga cantitate de acid ascorbic din soluţie să fie oxidată prin trecerea sa peste enzima insolubilizată (1,0—1,2 ml/min). După folosirea preparatelor enzimatice în condiţiile de regim continuu sau discontinuu s-a efectuat o nouă determinare a activităţilor lor catalitice, după metoda Brad şi colab. nemodificată [13].

Influenţa pH-ului asupra activităţii enzimatice a peroxidazei libere şi cuplate, s-a urmărit folosind în mediul de incubare valori de pH de 3,2; 3,7; 4,7; 5,7; 6,2 şi 7,0, situate sub şi peste pH-ul optim de acţiune al enzimei native nelegate.

Determinarea cantităţii enzimei legate de suport s-a efectuat prin dozarea azotului după micrometoda Parnas (ţinînd cont şi de cantităţile de azot iniţiale ale suportului).

În cazul extractului de hrean, concentraţia proteică a fost determinată prin spectrofotometrare la 280 nm, folosind graficul de etalonare construit cu albumină serică bovină cristalizată.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Extractul de peroxidază obţinut de noi din rădăcini de hrean prezenta în urma purificării sale parţiale prin precipizări cu sulfat de amoniu şi gel-filtrare pe Sephadex G—50 medium, o activitate enzimatică specifică de 180 μM ascorbat oxidat/min/mg proteină, ceea ce corespunde la un factor de purificare de 12. Prin legarea covalentă a peroxidazei din extract de hrean de CH-Sepharoză 4 B, în prezenţă de EDC, se obţine (după cum rezultă din tabela 1) un preparat enzimatic insolubil cu o activitate specifică de 109 μM ascorbat oxidat/min/mg proteină, ceea ce corespunde la o activitate enzimatică specifică reziduală de 60,6%. Concentraţia proteică găsită a fost de 10,2 mg proteină/ml/gel depus, ceea ce corespunde la un conţinut în proteină de 4%, calculat la greutatea uscată a suportului. Această valoare se încadrează foarte bine în limitele indicate de firmaMiles-Seravac [9] pentru peroxidaza legată covalent de CM-celuloză prin reacţia Curtius (1—10%). Folosind în locul carbodiimidei solubile amintite mai sus, diciclohexil-carbodiimidă insolubilă, randamentul de cuplare obţinut de noi a fost extrem de scăzut. Acesta poate fi şi unul din motivele pentru care Weetall şi colab. [10] folosind această carbodiimidă insolubilă la cuplarea ei de CM-celuloză, au obţinut un preparat de peroxidază insolubilizată cu o activitate reziduală relativ scăzută, de numai 7%.

Rezultatele obţinute la testarea capacităţii de refolosire a enzimei insolubilizate arată, pe de o parte, că gelul perlat al derivaţilor de agaroză îşi păstrează în cursul operaţiunilor proprietăţile sale mecanice excelente precum şi că preparatele enzimatice de CH-Sepharoză 4 B, practic nu-şi modifică activitatea enzimatică nici după 25 de refolosiri con-

Tabela 1

Activităţile enzimatice la 25°C ale peroxidazei libere, peroxidazei legate covalent de CH- şi AH-Sepharoză 4 B şi a preparatului enzimatic insolubil cu CH-Sepharoză 4 B deshidratat, uscat şi reîmbibat

Starea peroxidazei	Concentraţia proteică (mg proteină/ml)	Activitatea enzimatică prezentată de 1 ml extract sau preparat enzimatic insolubil (μM ascorbat oxidat/min)	Activitatea enzimatică specifică (μM ascorbat oxidat/min/mg proteină)	Activitatea enzimatică specifică raportată la enzima nelegată (%)
Enzimă liberă	16	2880	180	100
Enzimă legată de CH-Sepharoză 4 B	10,2	1110	103	60,6
Enzimă legată de AH-Sepharoză 4 B	4,7	672	143	78,1
Enzimă legată de CH Sepharoză 4 B uscată şi reîmbibată după 6 săptămîni	10,2	560	55	30,5

secutive în regim de lucru discontinuu şi nici în regim de lucru continuu, chiar după trecerea peste 1 ml de preparat enzimatic a 200 ml substrat, care corespunde la 0,2 g acid ascorbic. Aceste date confirmă cele găsite de noi şi în cazul folosirii drept suport a gelului perlat de agaroză activată cu BrCN [7]. Preparatele enzimatice insolubile ale peroxidazei, obţinute prin legarea acesteia de agaroză sau de derivaţi de sinteză ai ei, prezintă deci reale calităţi, cu perspective de aplicare mai ales în chimia organică preparativă.

Urmărind influenţa pH-ului asupra activităţii enzimatice a peroxidazei insolubilizate, în comparaţie cu cea nativă, se constată, după cum rezultă şi din figura 1, că prin legarea covalentă de suportul insolubil, peroxidaza nu-şi modifică practic pH-ul ei optim, prezentînd în general o curbă de activităţi enzimatice asemănătoare cu cea a enzimei native, nelegate.

Pentru a vedea influenţa uscării şi a păstrării în timp asupra activităţii catalitice a preparatului enzimatic insolubil, s-a uscat o parte din gel la temperatura camerei, după o prealabilă deshidratare cu acetonă. Preparatul reîmbibat, după o păstrare de 6 săptămîni la temperatura camerei, mai prezenta o activitate de 55 μM ascorbat oxidat/min/mg proteină, deci 50% din cea iniţială a preparatului insolubilizat. Preparatul enzimatic suspendat în soluţie tampon de acid acetic-acetat sau apă distilată nu-şi modifică practic activitatea în acest răstimp.

Folosind ca suport la cuplarea peroxidazei AH-Sepharoză 4B, se obţine un preparat a cărui activitate enzimatică specifică este cu aproximativ 18% mai ridicată (143 μM ascorbat oxidat/min/mg proteină)

decît în cazul folosirii de CH-Sepharoză 4 B. Această diferenţă de activitate enzimatică specifică s-ar putea datora unei afinităţi mai mari a peroxidazei pentru AH-Sepharoză 4 B, în comparaţie cu restul proteinelor prezente în extractul parţial purificat din rădăcini de hrean, legătura cu suportul insolubil realizîndu-se, la acest tip de suport, prin intermediul grupărilor carboxilice ale peroxidazei. În sprijinul acestei afirmaţii vine numărul mult mai mare de grupări carboxilice libere în comparaţie cu cel al grupărilor aminice din molecula peroxidazei (15), care se oglindeşte clar şi în compoziţia în aminoacizi a peroxidazei, dată de Shanon şi colab. [12], care au găsit un conţinut în acid aspartic de 14,4—16,8 g/100 g proteină şi în acid glutamic de 6,2 — 9,3 g/100 g proteină, în comparaţie cu un conţinut de lizină de numai 1,8 — 2,8 g/100 g proteină şi de histidină de 1 — 1,3 g/100 g proteină.

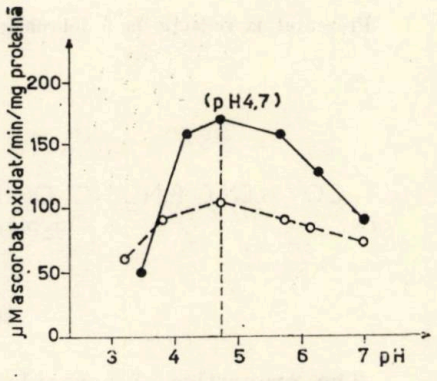


Fig. 1. — Variaţia activităţii enzimatice a peroxidazei legate şi libere în funcţie de pH.

O--- O --- O = peroxidaza legată
●—— ● —— ● = peroxidaza liberă

CONCLUZII

1. Prin legarea covalentă a peroxidazei de CH- şi AH-Sepharoză 4 B în prezenţa carbodiimidei solubile 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimidă (EDC), se obţin preparate de enzimă insolubilizată care posedă activităţi specifice reziduale de 60 %, respecitv 78 %.

2. Activitatea crescută cu 18 % a conjugatului cu AH-Sepharoză 4 B se datoreşte conţinutului crescut în grupări carboxilice libere al moleculei peroxidazei care determină o legare preferenţială a enzimei de acest suport.

3. Conţinutul diferit în proteină de 10,2 mg, respectiv 4,7 mg proteină/ml al preparatelor enzimatice insolubile obţinute se datoreşte numărului diferit al grupărilor active din molecula suporturilor respective (10 — 14 µM/ml gel în cazul CH-Sepharozei 4 B şi 6 — 10 µM/ml în cazul AH-Sepharozei 4 B).

4. Preparatul de peroxidază legată de CH-Sepharoză 4 B păstrează pH-ul optim de acţiune caracteristic enzimei libere.

5. Preparatul de peroxidază legat de CH-Sepharoză 4 B, deshidratat în condiţii blînde şi uscat, prezintă la reîmbibare, după 6 săptămîni de păstrare la temperatura camerei, o activitate specifică reziduală de peste 50 % din activitatea sa specifică iniţială. Preparatul păstrat suspendat în soluţie de tampon acetat sau în apă distilată nu-şi modifică activitatea sa catalitică în acest răstimp.

6. După zeci de refolosiri consecutive, preparatele de peroxidază legate de CH- şi AH-Sepharoză 4 B, nu-şi micşorează practic activitatea catalitică.

Mulţumim şi cu această ocazie firmei Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Suedia, pentru punerea la dispoziţie a suporturilor CH- şi AH-Sepharoză 4 B.

Prezentat la redacţie la 5 februarie 1974

Institutul de Ştiinţe Biologice
Departamentul de biochimie
Bucureşti

COVALENT BINDING OF PEROXIDASE ON CH- AND AH-SEPHAROSE 4 B

SUMMARY

The properties of peroxidase insolubilized by covalent binding on CH- and AH-Sepharose 4 B in the presence of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) are described. CH-Sepharose 4 B bound peroxidase yields an enzyme preparation with a residual specific activity of 60.6 %. When bound on AH-Sepharose 4 B, the residual specific activity is of 78 %. The reasons of this difference in the catalytic activity of the two insolubilized enzyme preparations are discussed.

By covalent binding on CH- and AH-Sepharose 4 B peroxidase exhibits no changes in its pH optimum; it virtually keeps the same activity after being used tens of times.

Insolubilized peroxidase preparations, dried and reimbibed after being stored for 6 weeks at room temperature still display 50 % of the initial specific activity of the insolubilized enzyme. Stored in acetate buffer, enzyme preparations keep their activity unchanged during all this interval.

BIBLIOGRAFIE

1. J. Gryszkiewicz, Folia Biologica, **19**, 119 (1971).
2. G. J. H. Melrose, Rev. Pure and Appl. Chem., **21**, 83 (1971).
3. H. D. Orth, W. Brümmer, Angew. Chemie, **84**, 319 (1972).
4. D Gabel, B V. Hofsten, Eur. J. Biochem., **15**, 410 (1970).
5. * * * Sephazyme, insolubilized enzymes, broşură editată de Firma Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suedia, aprilie 1970.
6. H. D. Schell, F. Ionescu-Stoian, St. cerc. biochim., **16**, 203 (1973).
7. H. D. Schell, A. Turcu, M. A. Mateescu, Rev. roum. Biochim., **10**, 233 (1973).
8. P. Cuatrecasas, J. Biol. Chem., **245**, 3059 (1970).
9. * * * Enzite, Insolubilized Enzymes, broşură editată de firma Miles-Seravac (Pty Ltd., Moneyrow Green, Holyport, Maidenhead, Berks, England, Januar 1970, nr. 2, p. 14).
10. H. H. Weetall, N. Weliky, Anal. Biochem., **14**, 160 (1966).
11. N. Weliky, F. S. Brown, E. C. Dale, Arch. Biochem. Biophys, **131**, 1 (1969).
12. L. M. Shanon, E. Kay, J. L. Lew, J. Biol. Ceem., **241**, 2166 (1966).
13. I. Brad, G. Olteanu, Z. Marcu, St. cerc. biochim., **12**, 323 (1969).
14. A. N. Bojarkin, Biohimiia, **16**, 352 (1951).
15. D. R. Moris, L. P. Hager, J. Biol. Chem., **241**, 1763 (1966).

ST. CERC. BIOCHIM., 17, 3, 313–317 (1974)

RECENZII

The plasma membrane: dynamic perspectives, genetics and pathology (Membrana plasmatică: perspective dinamice, genetică și patologie). Editat de D.F.H. Wallach, Springer-Verlag, New–York, Heidelberg, Berlin, 1972, 186 p.

Volumul 18 al Bibliotecii de Știință Heidelberg este consacrat unui amplu studiu asupra membranei plasmatice, considerată ca un ansamblu de numeroase sisteme reglate specific, atît funcțional cît și genetic, și dispuse la periferia celulei, fiecare conținînd receptori bine definiți, cu roluri biologice în permeabilitate și transport.

Cartea prezintă concepțiile moderne privitoare la membrana plasmatică și constituie un ghid ce tratează aspectele esențiale ale biologiei membranei, dintre care le enumerăm numai pe cele genetice, imunologice, pato-fiziologice. După prezentarea actualelor tehnici de izolare și fracționare, sînt conturate metodele speciale de studiu, o importanță deosebită acordîndu-se celor biochimice și spectroscopice. Sînt abordate, totodată, efectele diferitelor radiații asupra membranelor, în strînsă corelație cu compoziția și principalele lor funcții. Trebuie să amintim că membrana plasmatică joacă un rol important în identificarea celulei, în pătrunderea drogurilor, acțiunea virușilor, a toxinelor, în transferul informației extracelulare, în receptivitatea imunologică, în interacțiunile dintre celule etc. Anumite defecte de transport la nivelul membranei se repercutează în unele boli maligne și benigne, cum sînt: diabetul insipid, glicozuria și aciduria renală, fibroza cistică, cancerul, bolile datorate paraziților.

Prin multitudinea și diversitatea problemelor abordate, prezentul volum se adresează, în egală măsură, biologului și medicului, geneticianului și imunologului, a căror muncă este ușurată de cele 722 indicații bibliografice și de indexuri de subiecte. Tabelele clare și numeroasele figuri conferă și o largă accesibilitate acestei cărți de ținută grafică ireproșabilă.

Ioana Hagima
Departamentul de biochimie
Institutul de științe biologice București

Hanbook of experimental pharmacology. Vol. 34, *Secretin, coolecystokinin, pancreozymin and gastrin* (Manual de farmacologie experimentală, vol. 34, Secretina, colecistokinina, pancreozimina și gastrina), M. Bodanszky, R. Carratù, D. A. Dreiling, R. Fussgänger, H. D. Janowitz, J. D. Jamkieson, J. E. Jorpes, V. Mutt, E. F. Pfeiffer, J. Plessier, M. L. Ramorino, S. Raptis, A. Torsoli, M. Zimmerman, Ed. J. E. Jorpes și V. Mutt, Springer, Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1973, 376 p.

Volumul de față se ocupă cu studiul hormonilor intestinali. Concepția reglării hormonale a activității organelor digestive datează încă de la începutul acestui secol. Totuși, structura hormonilor gastrointestinali a putut fi cunoscută abia în ultimii ani, începînd cu gastrina, în 1964.

Chimia acestor hormoni indică asemănări între structura secretinei și glucagonului, între cea a CCK și a gastrinei, de asemenea, între activitatea biologică a glucagonului și secretinei. Aceste aspecte sînt tratate în primul capitol al cărții.

Obținerea secretinei porcine pure, naturale și sintetice, a permis fiziologilor să cerceteze acțiunea ei biologică și aplicațiile clinice (cap. II).

Capitolul III prezintă aspecte morfologice și biochimice ale proceselor secretoare din celula pancretică exocrină.

Capitolul IV se ocupă de testul cu secretină al funcției pancreatice, iar un alt capitol cuprinde fiziologia hormonilor gastrointestinali.

Utilizarea colecistokininei în clinică, la examinarea roentgenologică a tractului biliar extrahepatic şi a intestinelor, face subiectul capitolului V.

Acţiunea specifică a acestor hormoni asupra vezicii biliare, sfincterului lui Oddi şi asupra peristaltismului intestinal oferă posibilitatea utilizării tehnicilor de colecistografie, colangiografie şi, în special, examinarea cu R—X a jejuno-ileonului, acestea fiind cuprinse în ultimul capitol.

Abordînd aspecte atît de noi ale problemei hormonilor gastrointestinali şi avînd o bibliografie şi o iconografie foarte bogată, cartea se dovedeşte deosebit de utilă biochimiştilor, biologilor şi medicilor interesaţi în acest domeniu.

Elena Ganea
Departamentul de biochimie Bucureşti

HEDI FRIEDMANN, ROSWITHA WINTER, *Diagnostische Enzymologie. Grundlagen und Anwendungen.* (Enzimologia diagnostică. Principii de bază şi aplicaţii), Editura : VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 1973, 207 p.

Incidenţa mare a determinărilor enzimatice în laboratoarele de biochimie clinică, precum şi valoarea deosebită a acestora în stabilirea diagnosticului diferitelor boli, au făcut ca cel de-al 12-lea volum al colecţiei „Ergebnisse der experimentellen Medizin" să fie afectat enzimologiei diagnostice. Volumul de faţă înmănunchează, de fapt, lucrările prezentate la a IX-a Sesiune anuală a Societăţii de Chimie Clinică şi Diagnostic Medical, din R. D. Germană care a avut loc la Leipzig în 1971.

Tematica acestor lucrări, se referă la determinări enzimatice cu rol definitoriu în conturarea unor diagnostice (ca de exemplu : valoarea izoenzimelor LDH în infarctul miocardic, importanţa activităţii alaninaminopeptidazei urinare în boli de rinichi, activitatea fenilalaninhidrozilazei la copii cu hiperfenilalaninemie şi fenilcetonurie clasică), valoarea unor teste enzimatice în diagnosticul tumorilor prostatei şi ficatului, conturarea unor metode tip pentru determinări enzimatice în laboratorul clinic, cum sînt determinările fluorimetrice ale activităţii unor enzime, o metodă cinetică pentru determinarea cantitativă a aldolazei hepatice şi musculare, determinarea histidazei din piele.

Detaliile experimentale, ilustrarea grafică, includerea unui rezumat ce însoţeşte fiecare lucrare, ca şi bibliografia aferentă fiecărui articol, uşurează consultarea volumului, făcîndu-l deosebit de util medicilor şi chimiştilor de laborator, care pot reproduce cu uşurinţă multe din testele prezentate.

Lucia-Doina Popov
Departamentul de biochimie
Institutul de ştiinţe biologice Bucureşti

Humanbiologie, Ergebnisse und Aufgaben (Biologie umană, rezultate şi sarcini) editat de H. Autrum şi U. Wolf cu contribuţii de la H. Baitsch, K. Bender, J. Biegert, W. Engel, H. Höhn, W. Krone, W. Lenz, H. Ritter, G. Röhrborn, F. Vogel, W. Wickler, U. Wolf, Editura Springer-Verlag, Berlin , Heidelberg, New York, 1973, 33 fig., 202 pag.

Volumul de faţă, al 121-lea din seria „Heidelberger Taschenbücher", şi-a propus ca în cele 14 capitole ale sale să schiţeze, într-o claritate exemplară, cadrul biologiei umane moderne şi să prezinte metodele şi rezultatele ei, pe bază de exemplificări concrete şi reprezentative. Biologia umană, care a cunoscut în ultimul timp o dezvoltare vertiginoasă, cercetează comportamentul, inteligenţa şi caracteristicile înfăţişării exterioare ale omului (originea, deosebirile rasiale, malformaţiile), proprietăţile caracteristice ale organelor şi celulelor (proprietăţile imunologice, cromozomii) şi ale moleculelor (proteinele, acizii nucleici).

Volumul cuprinde articole bine documentate, de mare actualitate şi interes ştiinţific, scrise într-un stil clar şi accesibil nu numai specialiştilor. Primele articole se referă la originea şi evoluţia omului, cu multiplele ei aspecte genetice şi biochimice. Urmează apoi articole dedicate unor probleme rasiale, ca de pildă ideologia rasială a naţional-socialismului german şi un proiect pentru o teorie modernă a raselor. Celelalte articole se ocupă, între altele, de cro-

mozomii la omul sănătos şi bolnav, de genetică şi inteligenţă, de rolul eredităţii şi al mediului ambiant în apariţia malformaţiilor, de aspecte genetice ale transplantelor de organe, de conceptul eugenetic şi de viitorul genetic al omului, şi altele. Unele din articole sînt bogat ilustrate şi posedă indicaţii bibliografice. Un index amănunţit pe subiecte, vine în ajutorul cititorului pentru găsirea anumitor aspecte dintr-un domeniu atît de vast şi interesant cum este cel al biologiei umane.

Horst D. Schell
Departamentul de biochimie Bucureşti

T. J. FRANKLIN, G. O. SNOW. *Biochimie antimikrobieller Wirkstoffe.* (Biochimia unor substanţe cu activitate antimicrobiană). Volumul 116 din seria Heidelberger Taschenbücher, tradus şi prelucrat de W. Goebel, Editura Springer—Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1973.

Literatura de specialitate în acest domeniu este atît de bogată, încît în acest volum sînt cuprinse numai date recente, de o deosebită importanţă. Materialul se bazează pe prelegerile ţinute de autor studenţilor de la universităţile din Liverpool şi Manchester şi este o introducere în problemele biochimismului şi ale mecanismului de acţiune al produşilor antimicrobieni.

Materialul este sistematizat în 7 capitole, cu 75 ilustraţii (grafice, scheme, fotografii). Se începe cu un istoric al compuşilor antimicrobieni, se trece apoi la descrierea acţiunii selective a produşilor antimicrobieni, a acţiunii reciproce între agenţii antimicrobieni şi locul lor de acţiune şi la biochimia rezistenţei microbiene.

În capitolele II şi III se dau date cu privire la structura şi funcţia pereţilor celulari şi la acţiunea unor antibiotice asupra proceselor de biosinteză a acestora; se continuă cu descrierea acţiunii antisepticelor şi antibioticelor asupra membranei celulare.

În capitolele IV şi V este descris pe larg procesul de inhibare a funcţiilor genetice, prin acţiunea unor produşi asupra sintezei acizilor nucleici, pe de o parte, şi prin influenţarea translaţiei informaţiei genetice, pe de altă parte.

Urmează, în capitolul VI, cunoştinţe despre agenţii antimicrobieni care acţionează pe alte căi, şi anume la nivelul lanţului respirator (antimicina, oligomicina); la nivelul reacţiilor enzimatice prin blocarea sistemelor de transport ale unor metaboliţi necesari celulei, etc.

În capitolul VII este abordată problema rezistenţei microorganismelor faţă de produşii antimicrobieni, din punct de vedere genetic, biochimic şi clinic. În încheierea acestui capitol se tratează unele aspecte ale combaterii rezistenţei microorganismelor.

Fiecare capitol este urmat de o bogată literatură, recomandată ca o completare la subiectul respectiv.

Cartea are la început un cuprins pe probleme şi, în încheiere, un index alfabetic pe subiecte, care ajută consultarea materialului.

Viorica Elefterescu
Departamentul de biochimie
Institutul de ştiinţe biologice Bucureşti

Gewebevorbehandlung und Fixation in der Histochimie. Probleme biologisher Farbstoffe (Prelucrarea ţesuturilor şi fixarea în histochimie). Eds.: H. Vose, G. E. Voigt, J. H. Scharf, Acta histochemica, Suppl. XIII, Gustav Fisher Verlag, Jena, 1973, 419 p.

Acest volum reprezintă lucrările unui simpozion ţinut la Düsseldorf, în septembrie 1971, şi consacrat studiului fixării în histochimie şi problemei coloranţilor. Reunind pe cei mai importanţi histochimişti din Europa şi desfăşurîndu-se sub forma unor mese rotunde, cu numeroase intervenţii ale tuturor participanţilor, această întîlnire a prilejuit precizarea unor puncte de vedere şi stabilirea direcţiilor în care trebuie îndreptate cercetările viitoare.

Prima parte, consacrată problemei fixării ţesuturilor, se ocupă de mecanismul fixării diferitelor componente celulare: proteine, glicogen, acizi nucleici, lipide, calciu, cateholamine etc. Se expun cîteva principii generale care trebuie respectate obligatoriu pentru a putea

întreprinde investigații histochimice corecte. Se insistă asupra problemelor ridicate de o bună prezervare tisulară, în cercetările de imunochimie și de ultrastructură.

Partea a II-a, consacrată coloranților, se ocupă în special de puritatea substanțelor utilizate, de reproductibilitatea rezultatelor, de calitățile pe care trebuie să le aibă un bun reactiv histochimic. În aceste discuții, la care au luat parte și reprezentanții unor cunoscute firme producătoare de coloranți, s-au arătat metodele de analiză a purității substanțelor, investigarea calităților lor și posibilitatea obținerii unor produși similari în toate șarjele industriale.

Prin problematica atinsă, prin soluțiile propuse, prin competența participanților, acest simpozion a devenit un punct de referință pentru toți histochimiștii, ca și pentru alți cercetători preocupați de problemele fixării țesuturilor și a coloranților biologici.

Aurelia Bordeianu
Institutul de fiziologie normală și patologică
București

Central nervous system. Studies on metabolic regulation and function (Sistemul nervos central. Cercetări asupra reglării metabolice și funcției acestuia). Editori: E. GENZZANI, H. HERKEN, Springer-Verlag, Berlin. Heidelberg. New York, 1974, 249 p., 121 fig.

Volumul de față cuprinde lucrările prezentate în cadrul Simpozionului „Reglarea metabolică și activitatea funcțională în sistemul nervos central", care a avut loc la Saint-Vincent (Italia), la 16—17 septembrie 1972.

Cele trei capitole ale cărții reprezintă de fapt direcții majore în investigarea proceselor metabolice din sistemul nervos central: 1) Analiza biochimică a căilor metabolice; 2) Funcția membranei și neurotransmisia; 3) Cercetări farmacologice.

În primul capitol sînt prezentate date deosebit de valoroase asupra semnificației structurale și funcționale a glicoproteinelor cerebrale (C. Di Benedetta), asupra metabolismului acizilor nucleici (A. Giuditta), asupra metabolismului lipidic (G. Porcellati) etc.

Din cel de al doilea capitol menționăm ca reprezentative lucrările: „Allosteria și permeabilitatea membranelor celulare" (E. Schoffeniels), „Modificări în enzimele metabolismului acetilcolinei în cursul dezvoltării sistemului nervos central" (G. Giacobini, G. Filogamo), „Aspecte neurochimice ale comportării" (L. Valzelli).

Capitolul al treilea al cărții etalează rezultatele studiilor hormonale și farmacologice efectuate asupra sistemului nervos central. De un deosebit interes sînt articolele: „Interferența drogurilor neurologic active cu metabolismul RNA-ului cerebral" (E. Genazzani, R. Di Carlo), „Hipofizectomia și metabolismul proteinelor cerebrale" (M.E.A. Reith, W. H. Gispen, P. Schotman).

Actualitatea volumului de față este reflectată atît de problematica abordată, cît și de indicațiile bibliografice — numeroase și la zi — ce însoțesc fiecare articol. Condiția grafică a cărții este excelentă.

Volumul este deosebit de util medicilor, farmacologilor și biochimiștilor, constituind o sursă de documentare asupra stadiului actual al investigațiilor din domeniul metabolismului sistemului nervos central.

Doina Popov
Departamentul de Biochimie

R. A. KÜHN — Immunoelektrophorese-Fibel. Grundlagen und Anleitung zum Verständnis typischer Bilder (Abecedarul imunoelectroforezei. Baze și îndrumări pentru înțelegerea unor imagini tipice), VEB Gustav Fisher Verlag, Jena, Ediția a 2-a, 1974, 70 fig., 104 p.

Folosirea din ce în ce mai largă a tehnicilor imunoelectroforetice în laboratorul clinic a dus, în ultimii ani, la dezvoltarea deosebită a acestor metode, atît sub aspect calitativ cît și din punctul de vedere al aprecierilor cantitative.

Volumul de față sistematizează în mod didactic și concis bazele analizei imunoelectroforetice (cap. I.), prezentarea proteinelor plasmatice (cap. II.), analiza imunoelectroforetică a paraproteinelor (cap. III.), gene structurale și mutații controlate genetic ale proteinelor plasmatice umane (cap. IV.), modificări structurale ale proteinelor plasmatice și ale proteinelor din alte lichide ale corpului (cap. V.), posibilitățile oferite de imunoelectroforeză pentru analiza cantitativă a proteinelor (cap. VI.). Capitolele de tehnică experimentală propriu-zisă cuprind detalii de lucru, de compoziție a soluțiilor etc., fapt ce accentuează caracterul de îndrumător al acestui volum.

Literatura anexată — monografii și articole — furnizează cititorului o informare rapidă, pentru detalierea aspectelor urmărite. Volumul se încheie cu un index de subiecte și cu o anexă de figuri, cuprinzînd atît instrumentarul necesar analizelor imunoelectroforetice cît și unele imagini tipice. Calitatea și condiția grafică deosebită a figurilor completează detaliile teoretice și practice expuse în volum.

Cartea este utilă biochimiștilor, chimiștilor și medicilor de laborator, fiind un îndrumător prețios în desfășurarea și interpretarea analizelor imunoelectroforetice.

Doina Popov
Departamentul de biochimie

G. STUTTGEN, H. SCHAEFER, *Funktionelle Dermatologie* (Dermatologie functionala), Springer—Verlag, Berlin—Heidelberg—New York, 1974, 486 pag., 120 figuri, 338 tabele.

Noutatea și importanța acestei cărți constă în faptul că procesele din domeniul dermatologiei sînt considerate și analizate de pe pozițiile fiziologiei și biochimiei. Autorii construiesc sub acest aspect, un plan al cărții original și cît se poate de actual. Problematica tratată nu epuizează nici pe departe domeniul dermatologiei, mai ales în sectorul patologic; unghiul de concepție al fiecărui capitol, precum și al cărții în întregime acoperă însă domeniile conexe dermatologiei (fiziologia, biochimia, morfologia etc.), ca o necesitate a înțelegerii cît mai profunde a fenomenelor ce au loc la nivelul pielii. Într-un cuvînt, autorii tratează problemele dermatologice cît se poate de original, dar cu acea originalitate care în ultimii ani s-a impus pe plan mondial ca unică metodă capabilă să ducă înainte această știință.

Întregul material este împărțit în 35 capitole, dintre care putem aminti: enzimele și pielea, radiațiile și pielea, conținutul de apă al pielii, emoragiile cutanate, pielea și alergiile, eczema endogenă, electrobiologia pielii, permeabilitatea pielii, etc.

Valoarea cărții se datorează și materialului informativ la zi, majoritatea indicațiilor bibliografice fiind de ultimă oră.

Mioara-Cârsteanu
Departamentul de Biochimie al Institutului de științe biologie
București

„Studii și cercetări de biochimie" publică articole originale, de nivel științific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici, ca: *Viața științifică*, în care prin note scurte sînt aduse la cunoștința cititorilor unele manifestări din domeniul biochimiei: congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experiență între cercetătorii români și cei străini etc., *Recenzii*, în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în țară și peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugați să înainteze articolele, notele și recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuș, pe hîrtie de calc. Tabelele și ilustrațiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planșe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea acelorași date în text, tabele și grafice. Explicația figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de inițiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanțelor internaționale.

Responsabilitatea asupra conținutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondența privind manuscrisele, schimbul de publicații etc., se va trimite pe adresa Comitetului de redacție: str. Docenților nr. 20, București 63, Sectorul 1.

1974 SEP 11

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA

M. ŞERBAN şi D. COTARIU, **Biochimia contracţiei musculare.** 1970, 240 p., 20,50 lei.

L. DICULESCU, DOINA ONICESCU şi LETIŢIA MISCHIL, **Biologie celulară.** 1971, 420 p., 36 lei.

N. SĂLĂGEANU, **Fotosinteza,** 1972, 243 p., 5 pl., 13 lei.

V. D. MÎRZA şi H. ARAŢEI, **Biomorfologia corticalei ovariene la mamifere.** 1972, 180 p., 2 pl., 8 lei.

P. RAICU, M. IONESCU-VARO, G. GANCEVICI şi GABRIELA MOISESCU, **Celula. Structură, ultrastructură şi funcţii.** 1972, 344 p., 12 pl., 26 lei.

EUGEN MACOVSCHI, **Natura şi structura materiei vii.** 1972, 184 p., 4 pl., 15 lei.

I. V. DEACIUC, **Reglarea celulară a metabolismului glucozei şi acizilor graşi,** 1973, 255 p., 10,50 lei.

La revue „Studii şi cercetări de biochimie" paraît 4 fois par an. Le prix d'un abonnement annuel est de $ 5—. Toute commande à l'étranger sera adressée à Întreprinderea Rompresfilatelia, Boîte Postale 2001, telex 011631, Bucarest, Roumanie, ou à ses représentants à l'étranger. En Roumanie, vous pourrez vous abonner par les bureaux de poste ou chez votre facteur.

ST. CERC. BIOCHIM., TOMUL 17, NR. 3, P. 237—318, BUCUREŞTI, SEPTEMBRIE 1974

I. P. „Informaţia" — c. 1128

43316

Lei 20.—